UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1957 — N° 53

ÉTUDES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR LA NINHYDRINE, RÉACTIF DES AMINOACIDES.

(Travail du Laboratoire de Biochimie Médicale
de l'École de Médecine et de Pharmacie de Dakar.
Docteur E. NEUZIL, Maître de Conférences agrégé.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Samedi 18 Mai 1957

PAR

Jean-Christian BRETON

ASSISTANT DE BIOCHIMIE MÉDICALE A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DAKAR

Né à Bergerac (Dordogne), le 14 Avril 1930.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur..... *Président*
VITTE, professeur.....
PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*
NEUZIL, maître de conférences agrégé .....

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1958

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543917_0051

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1957 — N° 53

ÉTUDES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR LA NINHYDRINE, RÉACTIF DES AMINOACIDES.

(Travail du Laboratoire de Biochimie Médicale
de l'École de Médecine et de Pharmacie de Dakar.
Docteur E. NEUZIL, Maître de Conférences agrégé.)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le Samedi 18 Mai 1957

PAR

Jean-Christian BRETON

ASSISTANT DE BIOCHIMIE MÉDICALE A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DAKAR

Né à Bergerac (Dordogne), le 14 Avril 1930.

Examinateurs de la Thèse :

MM. TAYEAU, professeur..... *Président*
VITTE, professeur.....
PAUTRIZEL, professeur..... *Juges*
NEUZIL, maître de conférences agrégé .....

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1958

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPERIÉ, CHELLE, G. PORTMANN.

DOYEN : M. SIGALAS. — **ASSESSEUR** : M. TAYEAU.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, LANDE, DUVERGEY, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS, CREYX, MAURIAC, GOLSE.

PROFESSEURS TITULAIRES :

MM.	
G. PORTMANN	Clinique d'oto-rhino-laryngologie
F. PAPIN	Clinique chirurgicale
R. SIGALAS	Zoologie et parasitologie
E. AUBERTIN	Clinique médicale et des maladies infectieuses
X. J. DUBECQ	Clinique odonto-stomatologique
G. VITTE	Pharmacie
R. FABRE	Physiologie
P. DELMAS-MARSALET	Clinique des maladies nerveuses et mentales
C. JOULIA	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques
M. RIVIERE	Clinique d'accouchements
R. DE GRAILLY	Clinique médicale
R. DARGET	Clinique des maladies des voies urinaires
P. DERVILLÉE	Médecine légale et médecine du travail
A. FONTAN	Clinique médicale des maladies des enfants
N.	Hygiène et Clinique de la tuberculose
C. PIFFAULT	Physique médicale et pharmaceutique
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée
J. REBOUL	Electroradiologie et clinique d'électricité médicale
L. MASSÉ	Clinique chirurgicale
R. GIRARD	Botanique et cryptogamie
P. MESNARD	Chimie
R. DUFOUR	Anatomie

MM.	
P. BROUSTET	Clinique médicale
J. MAGENDIE	Clinique gynécologique
F. TAYEAU	Chimie biologique et médicale
G. MAYER	Anatomie générale et histologie
P. BLANQUET	Physique pharmaceutique (T. P.)
R. SARIC	Pathologie générale et expérimentale
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale infantile et orthopédie
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et Clinique des maladies de l'appareil digestif
F.-J. TRAISSAC	Thérapeutique
R. MAHON	Accouchement et obstétricie sociale
R. PAUTRIZEL	Immunologie (T. P.)
G. MOUSTARDIER	Bacteriologie
A. LACHAPELE	Carcinologie
P. CAZAUX	Hydrologie pharmaceutique (T. P.)
E. BESSIÈRE	Clinique ophtalmologique
H. LEGER	Anatomie pathologique et microscopie clinique
J. MASQUELIER	Matière médicale
G. MORETTI	Médecine et hygiène tropicales et Clinique des maladies exotiques
P. LAUMONIER	Pathologie et technique chirurgicales
J. LENG-LEVY	Pathologie médicale
R. LETAC	Pathologie chirurgicale des pays chauds

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

Mlle G. ROUGIER (Physiologie), MM. J. DESPONS (Oto-rhino-laryngologie), R. GOLSE (Pharmacie - 1re Section), E. NEUZIL (Biochimie médicale), R. QUILICHINI (Pharmacie - 2e Section), R. STOLL (Histologie).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM.	
F. RIGAUD	Anatomie
J. FAURE	Pathologie expérimentale
H. CABANIE	Anatomie

MM.	
J. DUHAMEL	Physique médicale
P. ROMAIN	Pharmacie (1re Section)

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

MM. J. MARQUEVIELLE (Biochimie médicale); J. BIRABEN (Anatomie pathologique)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

MM.	
P. LE COULANT	Dermatologie et syphiligraphie
M. BERGOUIGNAN	Médecine générale
J. CHAVANNAZ	Chirurgie générale
P. VERGER	Pédiatrie et puériculture
J. LANGE	Urologi
L. CHASTRUSSE	Obstétricique
P. L'EPEE	Médecine légale et médecine du travail
J. VILLAR	Chirurgie générale
R. TINGAUD	Chirurgie générale
J. DEPAULIS	Chirurgie générale
A. LAVIGNOLLE	Médecine générale

MM.	
G. FAUGERE	Obstétrique
P. BENOIT	Odonto-stomatologie
C. MARTIN-DUPONT	Médecine générale
J. DAVID-CHAUSSE	Médecine générale
J. RIVIERE	Médecine générale
P. DARMAILLACQ	Chirurgie générale
L. CORCELLE	Ophtalmologie
M. PORTMANN	Oto-rhino-laryngologie
P. FREOUR	Pneumo-phtisiologie
M. BLANC	Neurologie et psychiatrie

CHARGÉS DE COURS COMPLÉMENTAIRES :

MM	
J. DESPONS	Oto rhino-laryngologie
L. CHASTRUSSE, G. FAUGERE, P. VERGER, G. PERY	Accouchements / Puériculture
F. COUSTOU	Législation pharmaceutique
M. LAUBIE	Cryptogamie
G. TEMPERE	Organographie et physiologie végétale
R. NIVET	Chimie biologique analytique
R. BABIN	Chimie analytique
J. VILLAR, J. CHAVANNAZ, R. TINGAUD, F. LAPORTE	Pathologie chirurgicale
J. BAILENGER	Zoologie pharmaceutique
Mme LINQUETTE	Physiologie
Mlle LARGEBAU	Toxicologie et hygiène
R. CORTESI	Phytopharmacie
J.-M. AUBY	Droit médical international

MM.	
P. L'EPEE	Médecine légale
J. RIVIERE	Séméiologie médicale
J. DEPAULIS	Séméiologie chirurgicale
R. STOLL	Embryologie
DULONG DE ROSNAY	Bactériologie
M. BERGOUIGNAN, A. LAVIGNOLLE, J. DAVID-CHAUSSE	Pathologie médicale
J. de LOSTALOT	Pharmacodynamie
J. DUHAMEL	Statistique appliquée à la biologie
P. LE COULANT	Vénéréologie
H. PARIANGE	Optique
R. MANDOUL	Parasitologie
V. DARGELOS	Bactériologie
M. BLANC	Neuro psychiatrie
R. CANIVENC	Cytologie
Mlle LIERMAIN	Bromatologie
BANNEL	Psychiatrie médico-légale

Le Secrétaire principal de la Faculté : André GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

A TOUS CEUX, PARENTS OU AMIS,
QUI NOUS ONT ENCOURAGÉ, AIDÉ OU CONSEILLÉ
DURANT NOS ÉTUDES

En témoignage de notre profonde reconnaissance.

A LA MÉMOIRE DU DOCTEUR J. PEYROT

MÉDECIN-COLONEL DES TROUPES COLONIALES

ANCIEN PROFESSEUR A L'ÉCOLE D'APPLICATION
DU SERVICE DE SANTÉ DES TROUPES COLONIALES

MEIS ET AMICIS

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE BIOCHIMIE MÉDICALE
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MONSIEUR G. CÉSAIRE

DOCTEUR EN PHARMACIE

CHEF DE TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE MÉDICALE
A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DAKAR

A NOS MAITRES
DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SIGALAS

DOYEN DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

PROFESSEUR DE ZOOLOGIE ET PARASITOLOGIE

DIRECTEUR HONORAIRE DE LA STATION BIOLOGIQUE D'ARCACHON

OFFICIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

CROIX DE GUERRE

COMMANDEUR DES PALMES ACADÉMIQUES

CHEVALIER DANS L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

CHEVALIER DU MÉRITE MARITIME

COMMANDEUR DANS L'ORDRE DE L'ÉTOILE NOIRE

En hommage très respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PAYET

DIRECTEUR DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE DAKAR

Avec notre gratitude pour la bienveillance qu'il nous a témoignée.

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE DOCTEUR E. NEUZIL

MAÎTRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ DE BIOCHIMIE MÉDICALE

DOCTEUR ÈS SCIENCES

Avec beaucoup de dévouement, vous avez suivi notre travail depuis sa naissance jusqu'à sa rédaction. Vous nous avez sans cesse prodigué les conseils les plus éclairés et vous nous avez entouré de votre bienveillante sympathie.

Que notre Maître trouve ici l'assurance de notre profonde reconnaissance et de notre attachement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. PAUTRIZEL

DOCTEUR ÈS SCIENCES

DIRECTEUR DU LABORATOIRE DÉPARTEMENTAL DE SÉROLOGIE

EXPERT DE L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

CROIX DE GUERRE 1939-1945

CHEVALIER DES PALMES ACADÉMIQUES

Durant nos études, vous nous avez manifesté la plus grande bienveillance; vous nous en donnez une nouvelle preuve en acceptant d'être parmi nos juges, et nous vous en sommes très reconnaissant.

MONSIEUR LE PROFESSEUR G. VITTE

PROFESSEUR DE PHARMACIE

PHARMACIEN DES HÔPITAUX

MEMBRE CORRESPONDANT DE L'ACADÉMIE DE PHARMACIE

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

CHEVALIER DANS L'ORDRE DE LA SANTÉ PUBLIQUE

Vous nous faites l'honneur de siéger dans notre jury et nous vous témoignons notre respectueuse gratitude.

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. TAYEAU

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE ET MÉDICALE

ASSESSEUR DU DOYEN

DOCTEUR ÈS SCIENCES

OFFICIER DES PALMES ACADÉMIQUES

MÉDAILLE D'HONNEUR DU SERVICE DE SANTÉ DE LA MARINE

La qualité et le charme de votre enseignement de biochimie médicale a eu sur notre orientation une influence décisive. Vous vous êtes toujours intéressé à notre travail avec beaucoup de sollicitude. Vous nous faites maintenant le grand honneur d'accepter la présidence de notre thèse et nous tenons à vous assurer de notre profonde gratitude.

ÉTUDES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR LA NINHYDRINE, RÉACTIF DES AMINOACIDES

INTRODUCTION

L'acquisition des connaissances dans les divers domaines de la biochimie, comme d'ailleurs dans beaucoup d'autres disciplines, ne s'effectue pas d'une manière régulière. L'utilisation et la mise au point de techniques nouvelles entraînent de nouvelles découvertes et suscitent de nouvelles hypothèses; puis succède une période de stabilisation qui, à plus ou moins brève échéance, sera suivie à son tour d'un bond en avant lorsqu'un chercheur proposera des moyens inédits d'investigation.

Nulle part mieux que dans l'étude des protéines on n'observe une telle courbe des progrès scientifiques, formée de la juxtaposition de segments à forte pente et de plateaux. Nos conceptions sur la structure des protéines sont jalonnées de nombreuses bornes qui correspondent toutes à des acquisitions purement techniques : la séparation chimique des aminoacides, l'utilisation des enzymes protéolytiques spécifiques, l'électrophorèse, la diffraction des rayons X, l'ultracentrifugation, l'emploi des isotopes lourds ou radioactifs, la chromatographie constituent quelques étapes capitales qui reflètent les orientations successives de la protéidologie.

La généralisation des méthodes de chromatographie de partage, sur papier ou sur colonne, apparaît directement responsable des progrès considérables dont a bénéficié la science des protéines au cours des toutes dernières années. Des molécules, gigantesques par rapport à celles dont s'occupent les organiciens, livrent peu à peu leurs secrets; l'insuline a cessé d'être une « albumine sécrétée par le pancréas » pour devenir, sous le scalpel chromatographique

de Sanger, une suite bien précise d'aminoacides dont la reproduction au laboratoire ne nous apparaît déjà plus comme une utopie, depuis que Du Vigneaud, en groupant en bon ordre huit aminoacides courants au sein d'un cyclopeptide, a pu faire la synthèse de substances possédant une spécificité d'action aussi étroite que celle de l'ocytocine ou de la vasopressine, ou depuis que les fragments inactifs d'un virus-protéine ont pu être regroupés en récupérant leur virulence première.

Dans les travaux les plus modernes, les chercheurs tirent grand parti d'un outil apparemment bien modeste, une tricétone qui donne avec les aminoacides une réaction colorée assez caractéristique. Cette tricétone, l'hydrate de tricétohydrindène, appelée bientôt « ninhydrine », est connue depuis près de cinquante ans puisqu'elle a été synthétisée à Cambridge en 1910 par un chimiste allemand, Siegfried Ruhemann; cet organicien se rendit compte, dès ses premières publications, de l'intérêt analytique pour la chimie des protéines du produit qu'il venait de synthétiser. Ce fait est d'autant plus remarquable à constater qu'on ne compte plus aujourd'hui les exemples, après le DDT, le γ-hexachlorocyclohexane, l'acide *p*-aminosalicylique et l'hydrazide de l'acide isonicotinique, de substances synthétiques dont les propriétés essentielles qui les ont imposées à l'attention du monde scientifique ont été découvertes des années après leur première préparation. La substance chimique qui guérira demain le cancer se trouve probablement dans quelque poussiéreux volume des « Justus Liebig's Annalen der Chemie », des « Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft », si ce n'est dans un tome de l'ancienne « Société chimique de Paris » !

Intéressé par la recherche scientifique dès le début de nos études médicales, c'est vers le Laboratoire de chimie biologique et médicale de la Faculté de médecine et de pharmacie de Bordeaux que nous nous sommes dirigé dès 1952; M. le professeur Tayeau, qui a bien voulu nous y accueillir, venait d'effectuer, avec plusieurs de ses élèves, des travaux relatifs à l'interférence de la ninhydrine sur les phénomènes immunitaires *in vitro* et avait montré la complexité du mécanisme d'action de la tricétone sur les protéines; aussi, lorsque le professeur Tayeau confia à son collaborateur, le docteur Neuzil, qui avait participé à ces recherches, le soin de diriger notre travail, acceptâmes-nous avec enthou-

siasme la suggestion d'entreprendre une étude systématique de la réactivité chimique de la ninhydrine vis-à-vis de substances plus simples afin de mieux pouvoir interpréter l'action de ce composé sur des produits de structure aussi complexe que les protéines. Ce sont ces recherches qui font l'objet de notre travail inaugural, accompagnées d'un certain nombre de données relatives aux propriétés physicochimiques de la ninhydrine et à l'exposé de quelques essais biologiques et pharmacodynamiques. Ces recherches, commencées à Bordeaux, ont été effectuées en majeure partie à Dakar. Nos travaux personnels sont précédés d'un exposé bibliographique où nous avons réuni les données, souvent fort éparses dans la littérature, concernant l'hydrate de tricétohydrindène.

Nous avons suivi le plan ci-dessous :

Première partie. — Exposé bibliographique concernant :

— La synthèse de la ninhydrine,
— Ses propriétés physicochimiques,
— Ses propriétés chimiques,
— Ses propriétés biologiques.

Deuxième partie. — Recherches personnelles où nous exposerons successivement :

1° Quelques nouvelles caractéristiques physicochimiques de la ninhydrine,
2° Quelques nouveaux dérivés de cette tricétone,
3° Une étude de quelques aspects de la réaction ninhydrine-aminoacides,
4° La synthèse de sels d'indanoquinoxalinium,
5° L'hémolyse des hématies traitées par la ninhydrine,
6° L'étude de la toxicité et de quelques propriétés pharmacodynamiques de la ninhydrine.

Avant de décrire ces renseignements théoriques et le détail de nos travaux personnels, il nous est agréable de rendre hommage, ici, à tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail.

Nous voulons remercier tout d'abord M. le professeur Tayeau, grâce à qui nous avons pu nous initier à la recherche scientifique. Il nous a accueilli dans son laboratoire et nous a toujours témoigné la plus bienveillante attention. Nous l'assurons de notre profonde reconnaissance.

C'est ensuite vers M. le docteur NEUZIL, maître de conférences agrégé, que va toute notre gratitude. Dès notre arrivée, il nous a guidé avec beaucoup de patience et de persévérance. Lorsque, détaché auprès de l'Ecole de médecine de Dakar, il nous donna la possibilité de le suivre, nous avons accepté avec empressement cette occasion qui nous était offerte de bénéficier encore de sa vaste culture et de son érudition. Grand expérimentateur, mais aussi continuellement à la recherche d'idées générales et de synthèse, il a essayé de former notre sens critique et a été pour nous le meilleur des maîtres.

M. le docteur MARQUEVIELLE, chef de travaux pratiques, nous a fait profiter avec combien de bonne grâce et d'amabilité de ses vastes connaissances; nous l'en remercions chaleureusement. L'ambiance favorable a su être créée par nos camarades de laboratoire; nous adressons notre souvenir le plus amical à tous, et en particulier au docteur J. SEGONNE avec qui nous avons eu le plaisir de partager longtemps la même « paillasse ».

Les recherches que nous allons exposer nous ont fait pénétrer dans de nombreux domaines spécialisés de la chimie ou de la biologie et souvent notre inexpérience nous aurait empêché d'aborder ces problèmes si nous n'avions pu bénéficier d'aides généreuses.

M[lle] JOSIEN, professeur de chimie minérale à la Faculté des sciences de Bordeaux, a accepté de réaliser pour nous une étude spectroscopique infrarouge de la ninhydrine. Nous lui témoignons ici notre respectueuse gratitude.

M. le docteur LEMAÎRE, maître de conférences agrégé de physiologie et M. le docteur BOURA, chef de travaux pratiques, nous ont permis d'aborder l'expérimentation animale et nous ont fait profiter très aimablement de leur grande compétence. Nous les assurons de toute notre reconnaissance.

M. le docteur SCHMITT, maître de conférences agrégé de pharmacologie, nous a initié aux techniques de sa discipline; nous l'en remercions vivement.

Nous remercions également M. CLASTRES, assistant de minéralogie à la Faculté des sciences de Bordeaux, pour les

diagrammes de diffraction des rayons X qu'il a bien voulu effectuer pour nous, ainsi que M. le docteur Darrasse, de l'Institut Pasteur de Dakar, qui s'est aimablement chargé de l'expérimentation bactériologique.

Nous tenons enfin à exprimer tous nos remerciements à MM. les directeurs des laboratoires de microanalyse de l'Ecole normale supérieure de Paris, du Laboratoire municipal de la ville de Paris, de la Faculté de pharmacie de Paris pour l'exécution des analyses élémentaires.

Nos remerciements vont encore à M^me^ Goudour qui, malgré les difficultés du langage technique, a dactylographié avec un dévouement inlassable et un soin minutieux notre manuscrit.

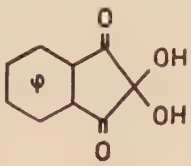
Nous n'oublierons pas enfin que l'impression de notre travail a été réalisable grâce aux possibilités matérielles que nous a données l'Institut des Hautes Etudes de Dakar.

PREMIÈRE PARTIE

LA NINHYDRINE

SYNTHÈSE
PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES
PROPRIÉTÉS CHIMIQUES
ASPECTS BIOLOGIQUES

Le terme de « ninhydrine », que nous avons trouvé mentionné pour la première fois dans un article de Halle, Loewenstein et Pribram [179], est universellement adopté pour désigner l'hydrate de tricétohydrindène (ou encore hydrate d'indanetrione).

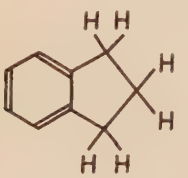


Selon Vlcek, Spalek et Kratki [493], il s'agirait d'une appellation commerciale donnée par l'I. G. Farbenindustrie.

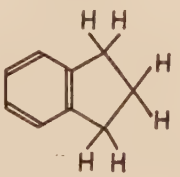
La ninhydrine, en raison même de sa structure, se rattache à deux chapitres importants de la chimie organique, celui de l'indane et celui des tricétones vicinales.

L'indane ou benzocyclopentane fait partie des benzocyclanes, hydrocarbures dans lesquels le noyau benzénique est condensé avec un cycle polyméthylénique. Son obtention par hydrogénation de l'indène lui a valu jadis le nom — impropre d'ailleurs — d'hydrindène, que l'on trouve encore parfois dans la littérature.

Les deux structures de résonance possibles :



I

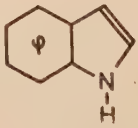


II

se trouvent résumées dans le schéma ci-dessous que nous adopterons au cours de ce travail et dans lequel nous avons figuré la numérotation classique :

En effet, si les travaux de Mills et Nixon [298], basés sur des calculs d'angles intervalenciels et de tension interne, plaident en faveur de la formule I, les études ultérieures de nombreux auteurs, dont Brockway et coll. [62] et Hunsberger et coll. [213], ont montré que l'énergie de résonance de l'indane est pratiquement la même que celle du benzène; Longuet-Higgins et Coulson [279] pensent même que la structure II est prédominante dans l'hybride.

Le noyau de l'indane est de connaissance relativement récente, puisque c'est seulement en 1884 que von Baeyer et Perkin [27] tentèrent sans succès de synthétiser l'homologue carboné de l'indole, auquel ils assignèrent le nom d'indonaphtène.



Indole.

Indonaphtène.

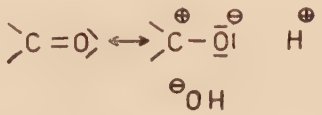
Cette substance ne fut extraite que six ans plus tard des goudrons de houille par Kraemer et Spilker qui l'hydrogénèrent bientôt en indane [244].

Remarquons que ce noyau est très peu répandu parmi les principes immédiats biologiques, puisque seuls les cycles C et D des stérols possèdent la même configuration. L'indène présent dans les goudrons de houille provient vraisemblablement d'une cyclisation de dérivés arylaliphatiques ou de composés naphtaléniques remaniés par régression du cycle. Nous verrons des applications de cette dernière modalité en étudiant les modes d'obtention de la ninhydrine.

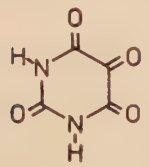
L'indanetrione provient du remplacement par trois atomes d'oxygène des atomes d'hydrogène situés sur le cycle pentagonal; comme plusieurs autres tricétones vicinales (*), cette substance se montre fortement colorée et s'hydrate facilement au niveau du groupement cétonique médian en donnant une forme incolore qui constitue la ninhydrine. La stabilité de la fonction cétonique hydratée provient de l'existence, de part et d'autre du carbone médian, de substituants fortement

(*) Notamment la pentanetrione-2,3,4 [393], la phénylméthyltricétone [394] et la diphényltricétone [319].

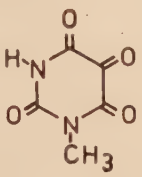
électro-négatifs; l'hydratation peut se représenter ainsi :



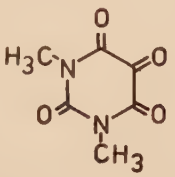
Il convient de rapprocher de la ninhydrine un certain nombre d'autres tricétones cycliques présentant de nombreuses analogies tant chimiques que biologiques; nous en donnerons simplement quelques exemples ci-dessous, leur étude débordant le cadre de ce travail.



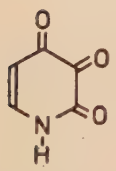
Alloxanne.



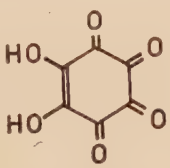
Monométhylalloxanne.



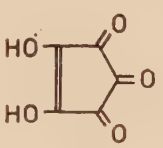
Diméthylalloxanne.



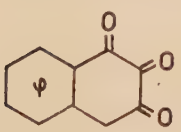
Tricéto-2,3,4-tétrahydropyridine.



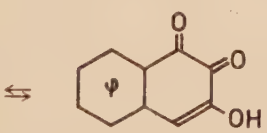
Acide rhodizonique.



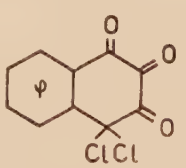
Acide croconique.



Tricéto-1,2,3-tétraline.



Hydroxy-3-naphto quinone-1,2.



Dichloro-4,4-tricéto-1,2,3-tétraline.

Dans la première partie de notre travail nous exposerons successivement les données concernant :

— La synthèse de la ninhydrine;
— Ses propriétés physicochimiques;
— Ses propriétés chimiques;
— Ses propriétés biologiques.

CHAPITRE PREMIER

SYNTHÈSE DE LA NINHYDRINE

Nous venons de rappeler la rareté dans les produits naturels du groupement des neuf atomes de carbone qui constituent le noyau de l'indane; aussi toutes les préparations de la ninhydrine consistent-elles en des synthèses totales, réalisées en définitive à partir de composés benzéniques.

Nous étudierons successivement dans ce chapitre :

— Les préparations à partir d'une indanone;
— Les préparations à partir de l'indanedione-1,3;
— Divers modes d'obtention.

I. — PRÉPARATIONS A PARTIR D'UNE INDANONE

Il est possible d'effectuer la synthèse de la ninhydrine aussi bien à partir de l'indanone-1 que de l'indanone-2.

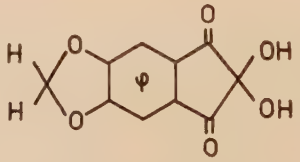
A. — Préparations a partir de l'indanone-1

C'est la méthode originale de Ruhemann [387]. L'α-hydrindone est elle-même facilement accessible, notamment par la méthode de Kipping [239], qui utilise l'acide cinnamique comme matière première; ce composé est réduit en acide phénylpropionique dont le chlorure d'acide, par la réaction de Friedel et Crafts, se cyclise en α-hydrindone.

L'α-hydrindone subit ensuite la réaction de Sachs et Barchall [393] qui transforme un groupement méthylénique en groupement carbonylé : l'indanone-1 est condensée avec

deux molécules de *p*-nitroso-N-diméthylaniline et fournit une dicétimine en 2-3, dont la structure a d'ailleurs été contestée (voir plus loin, p. 34) ; ce dernier composé, qui se sépare sous forme de beaux cristaux verts, est hydrolysé par l'acide sulfurique dilué en hydrate de tricétohydrindène, extrait du milieu par l'éther ou par l'acétate d'éthyle [387]. Le rendement, selon BERTRAND [41], est de 6,1 g de tricétone hydratée pour 100 g d'acide cinnamique.

Lorsque cette préparation s'effectue, non à partir de l'α-hydrindone, mais à partir d'un produit de substitution de cette cétone, on obtient une ninhydrine substituée; RUHEMANN [392] a ainsi transformé la méthylènedioxy-5,6-indanone-1 en méthylènedioxy-5,6-indanetrione, qui possède la même réactivité chimique que la ninhydrine [392, 309].



Méthylènedioxy-5,6-indanetrione.

B. — PRÉPARATIONS A PARTIR DE L'INDANONE-2

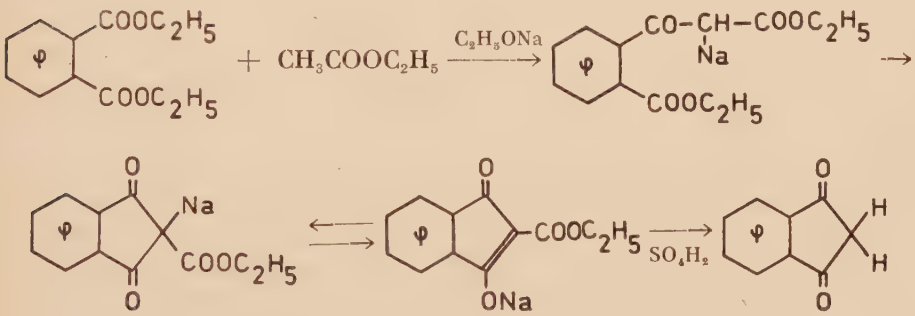
RUHEMANN a proposé ultérieurement [389] une préparation à partir de la β-hydrindone qui ne possède qu'un intérêt théorique puisque, selon les propres termes de l'auteur, elle est moins pratique que la précédente et occasionne de longues manipulations.

La β-hydrindone se prépare, entre autres, à partir de l'indène par l'intermédiaire du *trans*chloro-2-indanol-1 (obtenu par action successive du chlore et de l'alcool sur le carbure) ou par l'intermédiaire du *trans*- ou du *cis*-indanediol-1,2 (produit d'oxydation permanganique de l'indène) [206, 446].

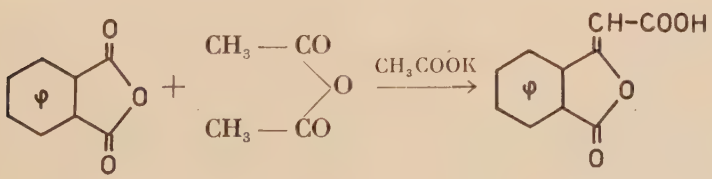
L'indanone-2 est alors soumise, comme précédemment, à l'action de la *p*-nitroso-N-diméthylaniline et la dicétimine en 1,3 est hydrolysée.

II. — PRÉPARATIONS A PARTIR DE L'INDANEDIONE-1,3

L'indanedione-1,3 renferme déjà, en bonne position, deux groupements cétoniques de la ninhydrine. Cette dicétone se prépare assez facilement en suivant les directives de Wislicenus [511, 512] : le phtalate d'éthyle est condensé en présence d'éthylate de sodium avec l'acétate d'éthyle; on obtient ainsi le dérivé sodé de l'ester éthylique de l'acide indanedione-1,3-carboxylique-2, qu'on hydrolyse en milieu sulfurique.

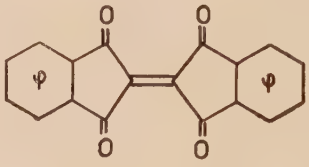


Cette méthode est celle suivie par la majorité des auteurs [389, 460, 175, 441, 472, 142]; on peut également utiliser comme point de départ le phtalate de méthyle [473]. Sans vouloir épuiser ici les nombreuses méthodes de synthèse de l'indanedione-1,3, signalons encore celle de Gabriel et Neumann [159], préconisée récemment par Dominguez [118] : l'anhydride phtalique se condense avec l'anhydride acétique en présence d'acétate de potassium pour donner l'acide phtalylindène acétique; traité par le méthylate de sodium, ce composé conduit à l'acide indanedione-1,3-carboxylique-2, qui est enfin hydrolysé en ninhydrine par l'acide chlorhydrique.



Le passage de l'indanedione à la ninhydrine exige l'oxydation du groupement méthylénique médian, ce qui peut être réalisé de plusieurs façons différentes.

a) Le premier auteur qui ait préparé l'indanetrione, dès 1897, est peut-être KAUFMANN [230]; cet auteur, soumettant l'indanedione-1,3 à l'action du perhydrol, a vraisemblablement obtenu, à côté du diphtalyléthylène, la tricétone, mais en quantité insuffisante pour en effectuer l'analyse.



Diphtalyléthylène.

b) RUHEMANN [389], fidèle à sa technique, a utilisé la *p*-nitroso-N-diméthylaniline et hydrolyse l'anile ainsi obtenue; ce procédé ne retient cependant pas sa faveur en raison du faible rendement en anile; d'ailleurs, TEETERS et SHRINER [460] n'ont pu obtenir ultérieurement de ninhydrine par cette voie, pas plus que par l'hydrolyse de la *β*-oxime de l'indanedione-1,3.

c) La découverte des propriétés oxydantes sélectives de l'oxyde de sélénium par RILEY et coll. [373] en 1932 amena, dès l'année suivante, TEETERS et SHRINER à étudier l'action de cet agent sur l'indanedione-1,3; les espoirs de ces chercheurs ne furent pas déçus, puisque l'oxyde de sélénium, en milieu hydro-dioxannique, permet de préparer la ninhydrine à partir de la dicétone avec un rendement de 31 à 35 p. 100 [460]. L'oxydation sélénique est employée depuis par d'autres chimistes [118, 441].

D'autres agents oxydants, comme le sulfate cérique, sont incapables de transformer l'indanedione en tricétone.

d) Nous devons à VANAG, qui a consacré de nombreux travaux à la nitroindanedione [472], de nouvelles méthodes de préparation de la ninhydrine à partir de l'indanedione; la dicétone est tout d'abord transformée en nitro-2-indanedione-1,3 par nitration dans l'acide acétique froid [498, 500]; la nitroindanedione peut encore être obtenue par oxydation de la nitroso-2-indanedione-1,3 [500].

La nitroindanedione, traitée à son tour par l'eau de brome,

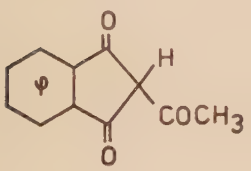
conduit à la bromo-2-nitro-2-indanedione-1,3 [498, 499]. Le dérivé bromonitré, chauffé avec le nitrobenzène, donne, à côté de la dibromo-2,2-indanedione-1,3, un mélange d'indanetrione anhydre et hydratée, qui, par recristallisation dans l'eau, fournit la ninhydrine avec un rendement global de 40 p. 100. Une préparation similaire peut être réalisée avec la chloro-2-nitro-2-indanedione-1,3 [499] ou avec l'iodo-2-nitro-2-indanedione-1,3 [472].

Des techniques, ne différant que par des détails, ont été proposées ultérieurement [175, 142].

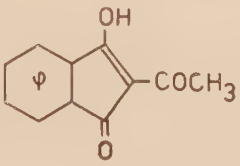
Divers procédés de décomposition de la nitro-2-indanedione-1,3, s'ils ont parfois donné un mélange possédant certains caractères analytiques de la ninhydrine, n'ont cependant pas permis à Vanag et Lode [499] d'isoler la tricétone; notons cependant la formation d'hydrindantine (voir p. 28) par chauffage du dérivé nitré dans l'acide acétique.

III. — MODES D'OBTENTION DIVERS

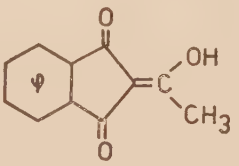
De nombreux essais, quelquefois couronnés d'un maigre succès, ont été effectués en vue de préparer la ninhydrine à partir d'autres dérivés de l'indane. Scheiber et Hopfer [402] en obtiennent par ozonolyse de l'acétyl-2-indanedione-1,3, ce qui suggère que ce dernier composé possède la structure III et non la structure I ou II.



I



II



III

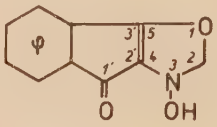
La benzoyl-2-indanedione-1,3, pour ces auteurs, ne peut fournir de ninhydrine dans ces conditions.

L'hydrolyse alcaline suivie d'acidification de la dicéto-1,3-acétoxy-2-indane, comme de la dicéto-1,3-benzoyloxy-2-indane, fournit de l'hydrindantine [197], ce qui implique l'obtention intermédiaire de ninhydrine.

L'ébullition prolongée des aminoacides avec la nitroso-2-indanedione-1,3 donne la coloration fournie dans les mêmes

conditions par la ninhydrine [500], sans qu'il soit possible de dire si la tricétone s'est formée intermédiairement.

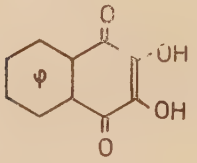
Plus récemment, Schönberg et Awad [409] ont obtenu la ninhydrine à partir de la monoxime-2 du tricétoindane, elle-même obtenue à partir de l'indanedione (voir plus loin, p. 31) ; l'action du diazométhane sur ce composé conduit à l'hydroxy-3-céto-1'-indéno-oxazoline-(2',3'-4,5), dont l'hydrolyse fournit la ninhydrine.



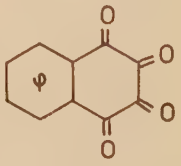
Hydroxy-3-céto-1'-indéno-oxazoline-(2',3'-4,5).

L'utilisation du diazoéthane fournit une réaction analogue.

Toutes les préparations et les divers modes d'obtention examinés jusqu'à maintenant utilisent un composé indanique, créé en définitive par adjonction d'un cycle pentagonal sur un noyau benzénique. Les essais de Khokhlov et coll. [237], au contraire, conduisent à la ninhydrine par régression du noyau naphtalénique. L'ébullition en solution aqueuse, saturée de gaz carbonique, décompose partiellement la dihydroxy-2,3-naphtoquinone-1,4 en ninhydrine (30 p. 100) et en produits apparentés à la tricétone, acide phtalonique (voir p. 27) et hydrindantine (voir p. 28).



Dihydroxy-2,3-naphtoquinone-1,4.



Tétraoxo-1,2,3,4-naphtalène.

Des réactions très voisines s'observent en dégradant le tétraoxo-1,2,3,4-naphtalène [237] :

Mode de dégradation	Produits obtenus		
	CO_2	Ninhydrine	Dihydroxy-2,3-naphto-quinone-1,4
Ebullition dans l'eau en présence d'air	+	44 p. 100	+
Ebullition dans l'eau en présence d'hydrogène	+	48 p. 100	+
Chauffage pendant vingt minutes à 129-131° C.	+	36,5 p. 100	35 p. 100

La tétracétone, dissoute dans une solution saturée de baryte, se transforme immédiatement en hydrindantine (19 p. 100).

CHAPITRE II

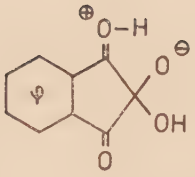
PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DE LA NINHYDRINE

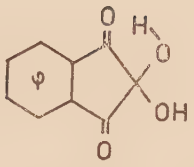
L'étude des propriétés physicochimiques d'un produit quelconque exige son obtention sous une forme très purifiée. Plusieurs techniques de purification ont été proposées dans le cas de l'hydrate d'indanetrione.

Ruhemann se contentait d'une recristallisation dans l'eau [387] ; cette technique a été reprise en présence de charbon actif par Moore et Stein [302] ; MacFadyen [283] effectue la même opération dans l'acide sulfurique décinormal. Lorsque la tricétone est préparée par oxydation sélénique de l'indanedione, l'élimination des dernières traces d'oxyde de sélénium (qui perturbe la réaction avec les aminoacides) est rendue possible par une recristallisation dans HCl 2N, avec un rendement de 94 p. 100 [182] ; plus récemment, un autre auteur a employé dans le même but le passage sur une résine échangeuse d'ions [218, 219].

La ninhydrine, une fois purifiée, se présente sous la forme de cristaux incolores ou faiblement colorés en jaune; ces cristaux se dissolvent dans l'eau en donnant une solution légèrement colorée en jaune; à la température du laboratoire, la solubilité maximum est d'environ 2 p. 100. La ninhydrine se montre soluble dans le méthanol, l'éthanol, le *n*-butanol, l'acétate d'éthyle; elle est très peu soluble dans l'éther. Nous reviendrons plus loin (voir p. 24) sur son comportement dans d'autres liquides organiques.

La solubilité dans l'eau peut s'expliquer, avec Schönberg et Moubasher [411], en admettant une structure de sel interne :





Les points de fusion donnés par les différents auteurs sont assez concordants :

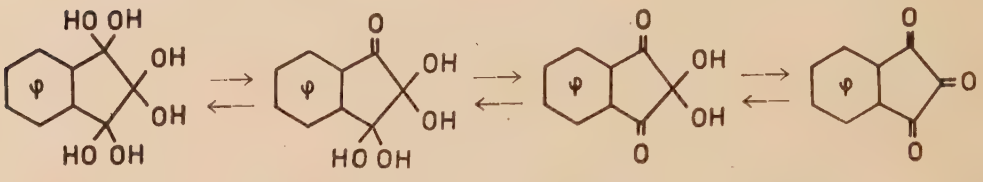
F = 239-240° C. (non corrigé) [387, 237].
F = 239-241° C. [118].
F = 240° C. [499].
F = 241° C. (non corrigé) [206].
F = 241-243° C. [460].
F = 247° C. (corrigé) [206].

Remarquons que, dès la température de 125° C., la tricétone perd son eau d'hydratation, ce qui se traduit par l'apparition d'une coloration rosée. Quant à la tricétone anhydre, elle fond à 255° C. [411] en donnant un liquide vert.

Dans le laboratoire même de Ruhemann, Purvis [369] a étudié le spectre d'absorption de la ninhydrine et de plusieurs de ses dérivés; Polonovski et coll. [357], puis MacFadyen [282, 283] ont donné ultérieurement des résultats très comparables, que nous résumons dans le tableau ci-dessous, emprunté à MacFadyen. Nous y avons inclus également les données relatives à la tricétone anhydre; on remarquera l'existence de trois maxima d'absorption pour les deux dérivés.

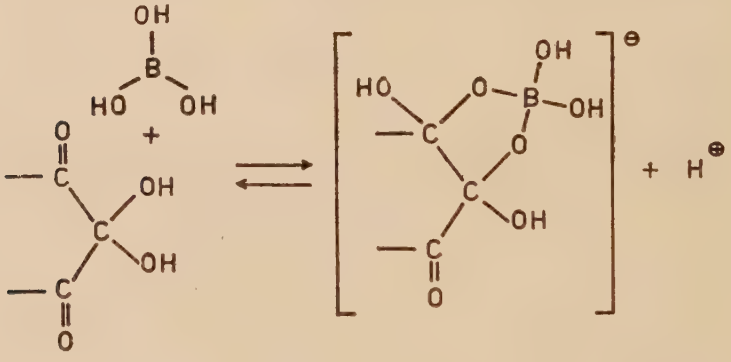
	Solvant	$\varepsilon_{max.}\ 10^{-3}$	$\lambda_{max.}$ mμ	Réf.
Ninhydrine	Ethanol		357	[369]
	Ethanol	0,1	357	[283]
	Ethanol 95 p. 100.....	0,1	362	[357]
	Ethanol 95 p. 100.....	10,4	247	[357]
	Ethanol	44,0	228	[283]
	Ethanol 95 p. 100.....	36,3	226	[357]
Indane-trione-1,2,3	Acide sulfurique	0,1	549	[283]
	Acide sulfurique	3,6	350	[283]
	Acide sulfurique	26,4	277	[283]

L'étude du comportement polarographique de la ninhydrine, entreprise à Prague par Vlcek, Spalek et Kratky [493] a fourni des graphiques complexes où l'on dénombre cinq vagues en tampon phosphate et trois vagues en tampon borate. Ceci ne peut s'expliquer que par la présence simultanée en solution aqueuse des quatre types de molécules ci-dessous, correspondant à la trione anhydre et à différentes variétés d'hydratation.



Les proportions relatives de ces différentes formes se montrent en rapport avec les conditions du milieu : *p*H, température, concentration saline, etc...

En présence d'acide borique, on doit admettre la formation de complexes de structure d'ailleurs tout à fait classique :



CHAPITRE III

PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DE LA NINHYDRINE

Les propriétés chimiques de la ninhydrine proviennent de l'existence dans la molécule de trois groupements cétoniques vicinaux : mais la réactivité des trois fonctions cétoniques n'est pas égale et l'hydrate d'indanetrione va se comporter, selon les cas, comme une mono-, une di- ou une tricétone. De plus, la fonction cétonique médiane manifeste des particularités réactionnelles dues à la présence des groupements cétoniques voisins : la réaction chromatique obtenue avec les aminoacides découle de cette dernière propriété.

Pour l'étude des propriétés chimiques de la ninhydrine, nous subdiviserons ce chapitre en trois sections distinctes :

— Nous examinerons tout d'abord l'action sur l'hydrate d'indanetrione de réactifs très généraux : chaleur, lumière, oxydants, réducteurs, acides et alcalis;

— La deuxième section rassemblera les réactions que la ninhydrine partage avec les autres composés cétoniques : nous étudierons donc les réactions fonctionnelles des groupements carbonylés de la tricétone;

— La ninhydrine possède toutefois une originalité parmi les composés carbonylés, celle de donner une réaction colorée intense avec les aminoacides; en raison de l'importance théorique et pratique de cette réaction, nous l'isolerons des autres propriétés du groupement carbonylé pour l'étudier en détail dans la troisième section de ce chapitre.

Section I

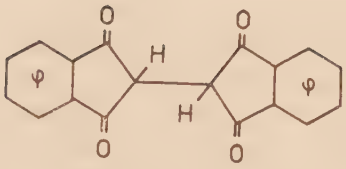
Réactions de la ninhydrine avec quelques réactifs chimiques généraux

La ninhydrine à l'état cristallisé est une substance assez stable. On note toutefois qu'une exposition prolongée à la lumière solaire la colore en rouge; le mécanisme de cette transformation ne semble pas avoir été étudié; Schönberg et Moubasher ont simplement noté que les cristaux devenus rouges, traités par l'eau chaude, libéraient l'iode à partir de l'iodure de potassium. Lorsqu'on chauffe la ninhydrine sous vide à une température de 190° C., l'eau d'hydratation de la fonction cétonique médiane s'élimine et l'on observe la formation d'un sublimat contenant des aiguilles rouges d'indanetrione-1,2,3 anhydre; ce dernier produit se sépare avec un meilleur rendement en traitant la ninhydrine par le chlorure de thionyle [411].

Nous étudierons dans cette section le comportement de la ninhydrine vis-à-vis de quelques réactifs chimiques généraux : acides, bases, agents oxydants et réducteurs.

I. — ACTION DES ACIDES ET DES BASES

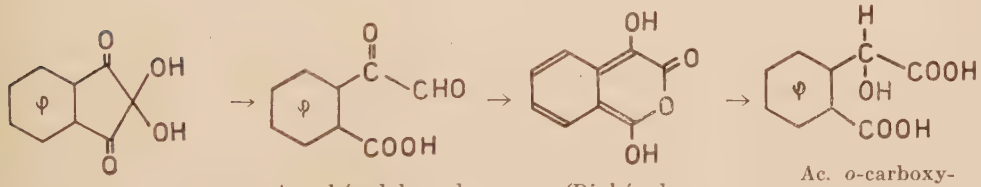
La ninhydrine est assez résistante à l'action des acides puisque nous avons vu précédemment que le meilleur procédé de purification consiste en une recristallisation dans HCl 2 N. L'ébullition de l'hydrate de tricétone en milieu sulfurique 0,005 N permet la récupération de 94,5 p. 100 du produit, le reste étant oxydé en acide phtalonique (voir ci-dessous) [237]. La ninhydrine est soluble dans l'acide acétique pur et ne semble pas décomposée dans ce milieu, car elle y manifeste les propriétés de la fonction carbonylée; notons cependant que la solution acétique anhydre est colorée en bleu-vert, ce qui semble indiquer une déshydratation puisque la tricétone non hydratée donne avec cet acide une solution de même coloration; cette même transformation, en milieu sulfurique, a été démontrée par la spectrophotométrie. L'acide sulfurique, dilué au demi avec de l'eau, chauffé avec la ninhydrine en présence d'un peu d'acide acétique, transforme toutefois la ninhydrine en bis-indanedione, comme l'ont montré Schönberg et Azzam [410].



Bis-indanedione.

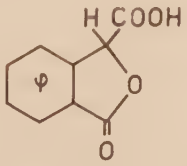
L'hydrate de tricétohydrindène apparaît au contraire beaucoup plus sensible à l'action des alcalis. RUHEMANN [387, 388] a bien montré la complexité des réactions; les cristaux incolores de ninhydrine deviennent jaunes en présence de potasse puis se dissolvent en donnant une solution jaune; cette solution vire au bleu, même à la température du laboratoire, si la concentration en alcali est importante; avec une solution plus diluée de potasse (à 15 p. 100), la coloration bleue n'apparaît qu'en chauffant la solution jaune dès la dissolution des cristaux. La coloration bleue disparaît alors à son tour.

Le chimiste de Cambridge invoque la séquence réactionnelle suivante : la ninhydrine est d'abord transformée en acide phénylglyoxal-*o*-carboxylique, dont la solution alcaline jaune réduit encore la liqueur de Fehling; la coloration bleue serait en rapport avec la formation d'un diphénol de structure *o*-quinoïdique, substance instable qui se transforme en acide *o*-carboxymandélique.



Ninhydrine. — Ac. phénylglyoxal *o*-carboxylique. — (Diphénol *o*-quinoïdique.) — Ac. *o*-carboxymandélique.

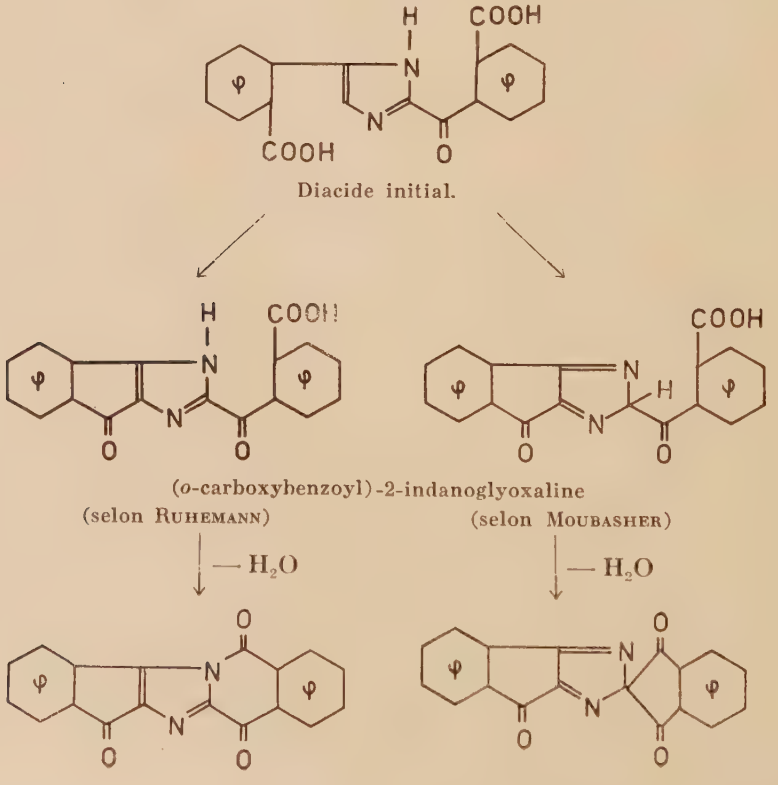
Ce mécanisme semble vérifié par l'isolement de l'acide phtalide-carboxylique, après addition d'acide sulfurique dilué dans la solution alcaline finale incolore.



Acide phtalide-carboxylique.

La transformation de la ninhydrine s'avère très rapide, comme l'ont montré KHOKHLOV et coll. [237] ; au bout d'une minute, la moitié de la ninhydrine présente est détruite, tandis qu'on peut isoler 40 p. 100 d'acide phtalide-carboxylique; ce dernier acide est formé presque quantitativement dès la troisième minute, tandis que des traces d'acide phtalonique peuvent être décelées après cinq minutes. MOUBASHER et coll. [310] ont pu toutefois isoler récemment un produit de réduction de la ninhydrine, l'hydrindantine (voir ci-dessous), au cours de l'action de la soude sur l'hydrate de tricétone.

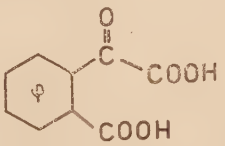
Dans sa première publication [387], RUHEMANN signale déjà que l'ammoniaque diluée réagit avec les solutions de ninhydrine en donnant une coloration rouge violacé; pour cet auteur, la première réaction consisterait en l'ouverture du cycle pentagonal et en la formation de l'*o*-carboxyphénylglyoxal, comme dans le cas de la potasse (voir p. 25) ; l'acide aldéhydique se condense alors avec l'ammoniaque pour donner un diacide qu'une déshydratation transforme en (*o*-carboxybenzoyl)-2-indanoglyoxaline :



Par action ultérieure d'acide chlorhydrique, Ruhemann isole effectivement cette substance qui cristallise de l'alcool en prismes écarlates; son spectre d'absorption a été donné par Purvis [369]. Elle contient encore un groupement carboxylique libre, et Moubasher [308], qui admet d'ailleurs une autre possibilité de formule, la déshydrate et obtient un composé pentacyclique pour lequel il propose une structure voisine.

II. — ACTION DES OXYDANTS ET DES RÉDUCTEURS

Comme toutes les cétones, la ninhydrine manifeste, en solution aqueuse, des propriétés réductrices : l'hydrate d'indanetrione réduit en effet la liqueur de Fehling comme les solutions de nitrate d'argent ammoniacal. Il se produit vraisemblablement, comme le suppose Ruhemann [387], une rupture de cycle avec formation d'acide phénylglyoxal-*o*-carboxylique qui s'oxyde en acide phtalonique.

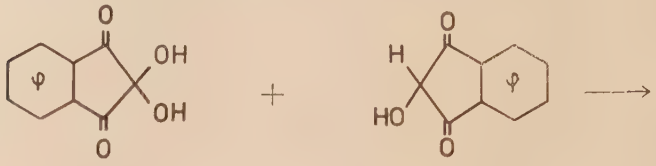


Acide phtalonique.

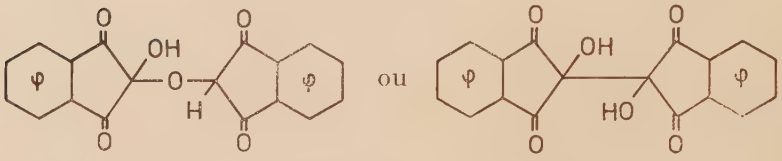
La ninhydrine, en solution aqueuse, se montre cependant assez stable [237] ; l'ébullition en milieu aéré permet de récupérer 84,5 p. 100 de la tricétone dont une partie s'est transformée en acide phtalonique (12,5 p. 100) ; en présence de gaz carbonique, l'oxydation est plus faible et les chiffres trouvés sont respectivement de 86,5 et de 4,5 p. 100. L'acide phtalonique prend également naissance par oxydation periodique [435]. Une oxydation plus violente transforme la ninhydrine en acide phtalique [402, 411, 314]. Remarquons que l'eau oxygénée a été utilisée pour détruire l'excès de ninhydrine au cours d'applications analytiques [433, 273].

Comme toutes les cétones également, la ninhydrine peut être réduite : sous l'influence de l'amalgame de sodium ou du chlorure stanneux, on passe au monoalcool correspondant, le dicéto-1,3-indanol-2 [390]. Cet alcool peut réagir sur une molécule de ninhydrine pour donner un produit de condensation, l'hydrindantine, dont la structure n'est pas encore

parfaitement élucidée, certains auteurs [371, 413, 313] préférant à la formule classique I la formule pinacolique II :



Ninhydrine. Dicéto-1,3-indanol-2.



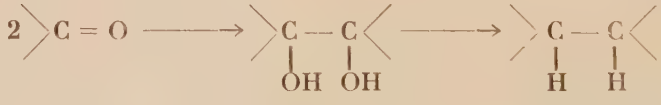
I II

Hydrindantine.

I : Formule classique.
II : Formule pinacolique.

L'hydrindantine peut être d'ailleurs directement obtenue par action sur la ninhydrine de substances réductrices comme l'hydrogène sulfuré [389], l'acide dialurique [390] ou l'acide ascorbique [12]; nous en rapporterons d'autres exemples dans notre partie expérimentale.

Si l'action de l'hydrogène sulfuré se prolonge, l'hydrindantine est réduite à son tour en bis-dicétoindane, ce qui confirme encore la structure pinacolique de l'hydrindantine, comme le montre le schéma ci-dessous :

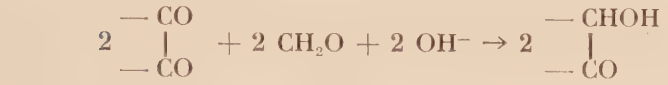


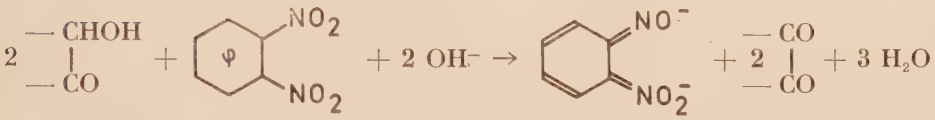
Ninhydrine. Hydrindantine. Bis-dicétoindane.

On obtient enfin l'hydrindantine à partir de l'indanetrione non hydratée par action de l'alcool isopropylique en présence de radiations solaires [412] ou sous l'influence de l'iodure de magnésium dans l'éther en présence de magnésium métallique (réactif de Gomberg-Bachmann [166]) [413].

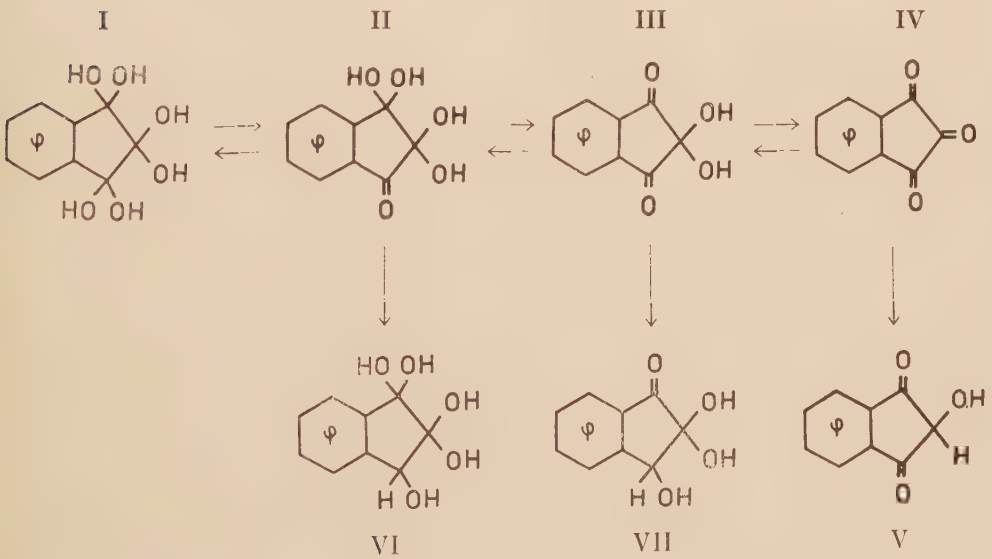
L'action catalytique que manifeste la ninhydrine sur la réduction par le formol [55] en milieu alcalin de l'*o*-dinitrobenzène en nitroso-1-nitro-2-benzène (dont le sel est forte-

ment coloré en violet) est interprétée par Feigl et Costa Neto [139], par la formation intermédiaire de dicétoindanol, selon le schéma :





La réduction polarographique donnerait également naissance au dicétoindanol [493], mais en raison des nombreuses formes que la ninhydrine peut présenter en solution aqueuse (voir plus haut, p. 22), on doit également admettre plusieurs types possibles pour l'alcool dicétonique; ces types correspondraient aux formules V, VI et VII du schéma ci-dessous :



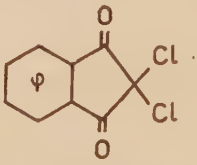
Section II

Réactions fonctionnelles des groupements carbonylés

L'action sur la ninhydrine des réducteurs que nous venons d'examiner, est également en rapport avec l'existence d'un groupement carbonylé. Nous envisagerons dans cette section des réactions plus spécifiques de la fonction cétonique obtenues principalement avec des composés azotés, l'interaction avec les aminoacides et les substances apparentées devant être étudiée séparément. Remarquons dès maintenant que de nombreux dérivés fonctionnels de l'indanetrione ne peuvent être obtenus directement à partir de la ninhydrine, mais sont synthétisés à partir de composés plus simples, notamment l'indanone et l'indanedione-1,3.

Action des halogénures de phosphore

Le traitement de la ninhydrine par PCl_5 s'accompagne, à la température de 100° C., d'un dégagement d'HCl et de l'apparition d'une coloration rouge qui traduit probablement la déshydratation et le passage à la tricétone; en présence d'oxychlorure de phosphore et de PCl_5, la réaction se poursuit, conduisant au dichloro-2,2-dicéto-1,3-indane [388] :

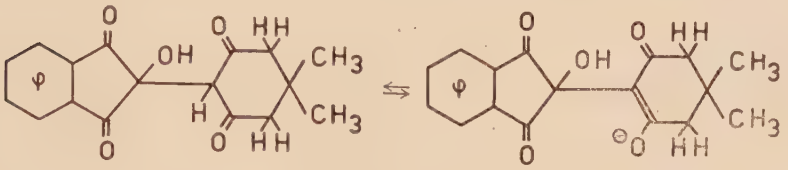


Dichloro-2,2-dicéto-1,3-indane.

Action des composés à hydrogène mobile

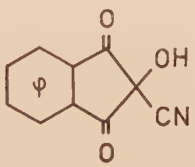
Bien que l'action des cétones sur les composés à hydrogène mobile soit une réaction classique, nous n'avons trouvé dans la littérature qu'une seule mention de son application à la ninhydrine. MacFadyen [283], traitant la ninhydrine en solution sulfurique par le dimédon ou diméthyldihydrorésorcinol,

obtient un produit de condensation incolore auquel il attribue les structures suivantes :



Action de l'acide cyanhydrique

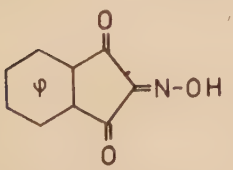
Le cyanure de potassium conduit, après l'apparition d'une coloration rouge, à la formation d'une cyanhydrine instable [388], qui précipite par acidification.



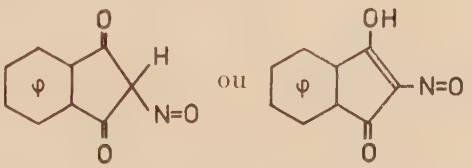
Action de l'hydroxylamine

L'action directe du chlorhydrate d'hydroxylamine sur la ninhydrine n'a permis à Ruhemann [387] que d'isoler un produit blanc, mélange de diverses oximes dans lequel le dérivé trisubstitué prédomine.

La monoxime (*), préparée dès 1888 par Wislicenus [512] en soumettant l'indanedione-1,3 à l'action de l'acide nitreux et, plus tard, par Ponzio et Pichetto [365], puis par Teeters et Shriner [460], doit être plutôt considérée, comme l'a fait remarquer Vanag [500], comme la nitroso-2-indanedione-1,3, qui existerait sous les deux formes ci-dessous :



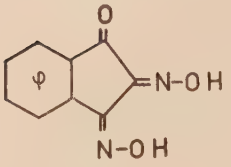
Indanetrionemonoxime (selon Wislicenus).



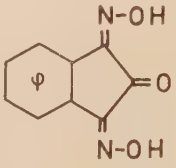
Nitroso-2-indanedione-1,3 (selon Vanag).

(*) Avec l'alloxanne, la monoxime correspondante est l'acide violurique, utilisé pour le dosage de la tricétone hétérocyclique [65].

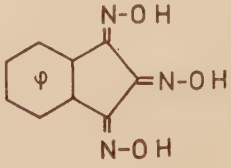
Deux dioximes ont été décrites : l'indanetrione-1,2-dioxime, synthétisée par action de l'hydroxylamine sur le dérivé précédent [365], et l'indanetrione-1,3-dioxime, obtenue en traitant l'indanone-2 par le nitrite d'isoamyle dans l'alcool chlorhydrique. [206]. La trioxime a été décrite par Wislicenus et Kötzle [513] et s'obtient par chauffage de la monoxime avec un excès de chlorhydrate d'hydroxylamine.



Indanetrione-1,2-dioxime.



Indanetrione-1,3-dioxime.



Indanetrione-1,2,3-trioxime.

Action des dérivés de l'hydrazine

L'action des dérivés de l'hydrazine sur la ninhydrine n'a encore été que très peu étudiée. Ruhemann [387], faisant agir sur la tricétone la phénylhydrazine en milieu acétique, isole une diphénylhydrazone colorée en rouge (F = 207-208° C.), dont le spectre d'absorption est donné par Purvis [369]. Ce composé a permis à Scheiber et Hopfer [402] de caractériser ultérieurement la ninhydrine, mais le point de fusion donné par ces auteurs est inférieur (F = 200° C.). Le produit décrit par Vanag et Lode [499], fond à une température encore plus basse (F = 180° C.).

La monophénylhydrazone ne semble donc pas isolable dans ces conditions opératoires. On l'obtient facilement en traitant l'indanedione-1,3 par le chlorure de benzène diazonium (Wislicenus et Reitzenstein [514]) ; en choisissant d'autres amines diazotables, on a pu décrire de la même manière la *p*-nitrophénylhydrazone, la *p*-tolylhydrazone, la *β*-naphtylhydrazone et le bis-(dicéto-1,3-indanylidènehydrazino)-4,4'-diphényle [107] ; tous ces dérivés correspondent à des produits de substitution de la fonction cétonique médiane.

Ruhemann a décrit une disemicarbazone [387] de coloration jaune.

Action des dérivés de l'acide carbonique

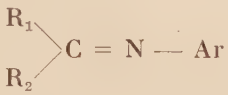
L'hydrate de tricétohydrindène se condense avec une molécule d'urée, comme l'a montré Bertrand [41] ; le spectre d'ab-

sorption [357, 283] est voisin de celui de l'urée; la décomposition de ce composé a été bien étudiée par Van Slyke et Hamilton [480].

On obtient des dérivés très voisins avec la monométhylurée [357], la diméthylurée asymétrique [357], la phénylurée [357], la guanidine [388, 283] et la créatine [41].

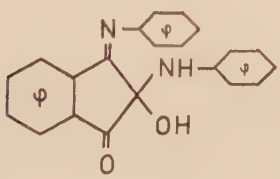
Action des monoamines

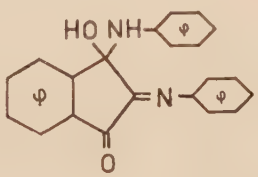
Les cétones réagissent avec les amines aromatiques pour donner des composés de type :



Il s'agit de cétimines, quelquefois appelées « anils » ou « bases de Schiff »; cette dernière dénomination devrait cependant être réservée aux produits de condensation des aldéhydes avec les amines.

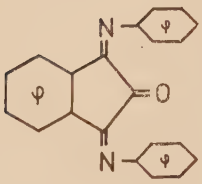
C'est encore à Ruhemann [387] que nous devons l'étude de la réaction ninhydrine-aniline; il obtient ainsi un produit jaune, instable, qui, par chauffage en milieu alcoolique, fournit une intense coloration violette; sa structure n'est pas examinée, car cet auteur ne fournit aucun résultat analytique. Un produit orange, synthétisé par Moubasher [308], se montre constitué par le dianil auquel les deux formules ci-dessous peuvent être attribuées :



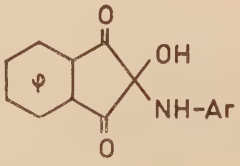


Le N-oxyde correspondant se prépare en traitant dans l'alcool l'indanone-1 par le nitrosobenzène, en présence de quelques gouttes de potasse alcoolique [347].

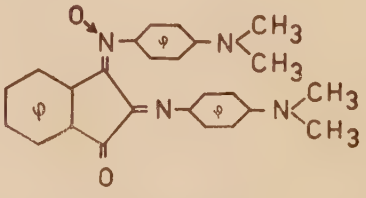
Nous n'avons pas trouvé mention, dans la littérature, du monoanil, tandis que l'indanetrione-dianil-1,3 a été préparé en 1941 par Pfeiffer et Hesse [346] en chauffant dans une solution alcoolique d'éthylate de sodium l'indanone-2 et le nitrosobenzène.



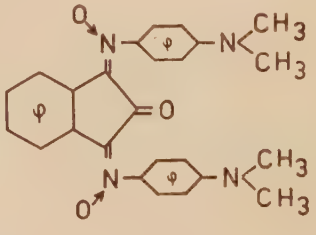
La ninhydrine réagit également avec les amines voisines de l'aniline : les produits obtenus par MOUBASHER [308] avec l'acide *p*-aminobenzoïque et le *p*-aminophénol sont des dérivés monosubstitués auxquels le chimiste cairote assigne la structure suivante :



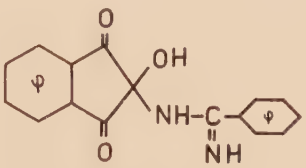
Les produits de condensation avec la *p*-phénylènediamine ou ses dérivés ont été obtenus indirectement; nous avons déjà signalé plus haut le rôle, dans la synthèse de la ninhydrine, du *p*-diméthylaminoanil-2 (également décrit par ZAKI [531]), ainsi que celui du bis-*p*-diméthylaminoanil-1,2 monohydraté et de son isomère en 1,3. La structure des deux bisdianils n'est peut-être pas celle envisagée par RUHEMANN [387, 389] : PFEIFFER et coll. préfèrent considérer ces produits, l'un comme un mono N-oxyde [347] :



l'autre comme un di N-oxyde [346] :

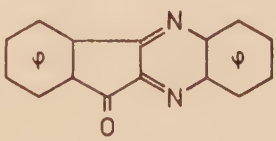


Rapportons encore l'obtention d'une cétimine avec la méthyl-2-amino-4-aminométhyl-5-pyrimidine [520, 521] ; nous pouvons rapprocher enfin des monoamines la benzamidine qui donne, selon Ruhemann [388], le produit :



Action des diamines

L'indanetrione, grâce à l'existence de deux fonctions cétoniques vicinales, réagit avec les *o*-diamines aromatiques. L'*o*-phénylènediamine, conduit ainsi, en milieu acétique, à la benzoylène-2,3-quinoxaline, ou cétohydrindénophénazine [387].



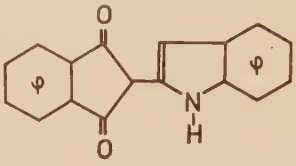
Ce produit, dont le spectre a été étudié par Purvis [369] et par MacFadyen [283], est peu soluble dans l'eau et permet ainsi à ce dernier auteur [281] d'éliminer la ninhydrine de certains mélanges destinés à l'analyse. Cette quinoxaline peut encore prendre naissance par hydrolyse du N-oxyde de l'anil de la benzoylène-2,3-quinoxaline et de l'homologue *p*-diméthylaminé correspondant, substances respectivement obtenues en traitant par l'*o*-phénylènediamine le N-oxyde de l'indanetrione-dianil-1,2 et le N-oxyde de l'indanetrione-bis-*p*-diméthylamino-anil-1,2 [347].

Le comportement particulier des diamines aliphatiques sera examiné plus loin (voir p. 57).

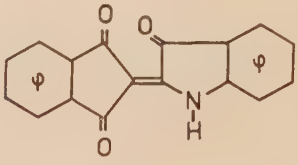
Action de divers composés hétérocycliques

Dès 1924, Tomita [465] signalait que la ninhydrine donne une coloration rouge avec l'urine contenant de l'indoxyle; en collaboration avec Fukagawa [466], il montre que l'hydrate

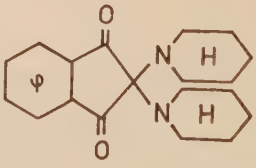
d'indanetrione réagit facilement avec l'indol pour donner, en solution aqueuse, le composé jaune :



En solution acétique, il obtient un produit rouge, probablement identique au composé préparé par son élève KUMON [255] en condensant la ninhydrine avec l'indoxyle :



D'autres composés hétérocycliques ont fait l'objet de travaux; la pipéridine [167] se fixe dans un premier temps sur la fonction cétonique médiane en formant la dipipéridino-2,2-indanedione-1,3,

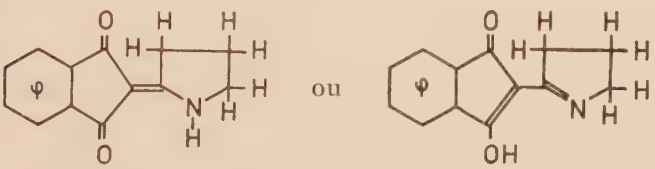


substance jaune qui, traitée par l'anhydride acétique, conduit à une bis-(dicéto-1,3-indanylidène-2)-pipéridine dont la structure n'est pas complètement élucidée; ce dernier produit est également obtenu par action de la ninhydrine sur l'acide pipécolique (acide pipéridine α-carboxylique), qui subit donc une décarboxylation. L'identité des deux substances a été confirmée récemment par SCHWEET [421], grâce à la spectrophotométrie.

Notons encore que l'acide hydroxy-5-pipécolique [351] et que la baïkiaïne (acide déhydro-4,5-pipécolique) [351] et l'acide nipécotique (acide pipéridine β-carboxylique) [168] réagissent avec la ninhydrine pour donner des composés colorés en rouge, tandis qu'un dérivé substitué sur l'azote, l'acide

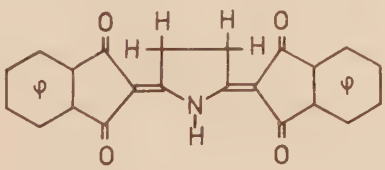
scopolique (acide N - méthylpipéridine - α,α' - dicarboxylique), apparaît inerte vis-à-vis de la tricétone [167].

La pyrrolidine et ses dérivés donnent lieu à des réactions voisines; l'acide pyrrolidine α-carboxylique se combine à la ninhydrine, en solution alcoolique, en fournissant un produit monosubstitué [167], tandis que l'on observe un dégagement de CO_2; ce produit peut correspondre *a priori* aux deux formules ci-dessous :

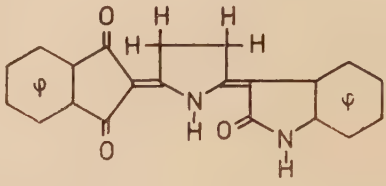
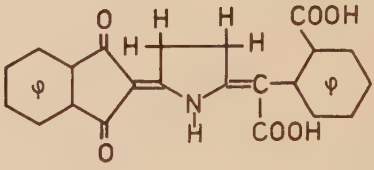
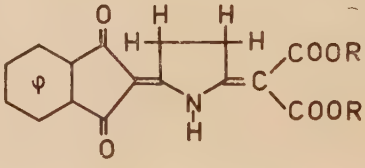


A B

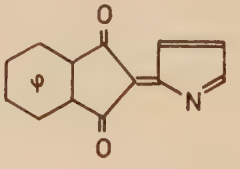
mais il semble que la seconde soit préférable en raison de l'inertie de l'acide igrinique (acide N-méthylpyrrolidine α-carboxylique). Avec la pyrrolidine, dans l'acide acétique bouillant, on obtient directement un dérivé disubstitué fortement coloré [167, 168], que fournit également la proline.



La formation de ce composé s'effectue probablement en deux temps : une première molécule de ninhydrine donne le composé *A* (ou B) qui réagit ensuite avec une nouvelle molécule de tricétone; il est d'ailleurs possible de condenser le composé A avec d'autres composés carbonylés [168] : on obtient également des composés bien colorés dont nous donnons les formules ci-après.

Composé carbonylé utilisé	Produit final	Coloration
Isatine		Rouge.
A. phtalonique		Bleu.
Ester mésoxalique		Bleu.

Avec le pyrrol [167, 168], on obtient un dérivé monosubstitué de structure :



On conçoit aisément que la formation d'un composé disubstitué ne soit pas possible dans ce cas particulier.

Section III

Réactions de la ninhydrine avec les acides α-aminés

Nous avons déjà signalé que Ruhemann, quelques mois seulement après la description de l'hydrate de tricétohydrindène [387], avait insisté sur l'intérêt de la réaction colorée que fournit la tricétone avec les acides aminés naturels [388]. Depuis 1911, un très grand nombre de publications ont été effectuées sur ce sujet; tandis que certains chercheurs ont essayé de pénétrer le mécanisme intime de la réaction, d'autres ont montré qu'une coloration bleue analogue pouvait être fournie par d'autres substances que les aminoacides. De nombreux essais ont eu pour but d'appliquer la réaction au dosage des aminoacides en solution et, plus récemment, à la mise en évidence de ces produits sur les chromatogrammes.

Nous avons collationné ces données très éparses dans la littérature et nous les résumons dans les pages ci-après en adoptant le plan d'exposition suivant :

I. — Mécanisme de la réaction ninhydrine-α-aminoacides.

II. — Spécificité de la réaction.

III. — Applications analytiques.

A. — Aminoacides.

B. — Autres substances.

IV. — Applications diverses.

A. — Réaction d'Abderhalden.

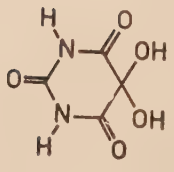
B. — Utilisation histologique.

I. — LE MÉCANISME DE LA RÉACTION NINHYDRINE-α-AMINOACIDES (*)

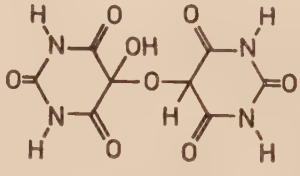
L'obtention d'une coloration bleue intense au cours de la réaction ninhydrine-aminoacides, la décarboxylation et la désamination de l'aminoacide qui se dégrade en aldéhyde possédant un carbone de moins, ont amené Ruhemann [389]

(*) Voir aussi [98, 325].

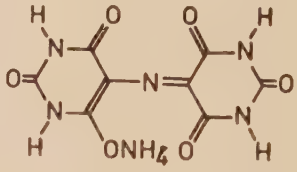
à envisager la parenté de cette réaction avec la réaction colorée que fournissent les α-aminoacides avec l'alloxanne, autre hydrate de tricétone vicinale. Près de cinquante ans auparavant, Strecker [445] avait montré en effet que l'acide aminé subit en présence d'alloxanne une perte de gaz carbonique et d'ammoniac en se transformant en aldéhyde; au cours de cette réaction, l'alloxanne est réduit en alloxantinne



Alloxanne.

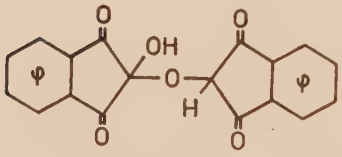


Alloxantinne.

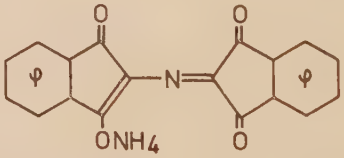


Murexide.

qui se combine à l'ammoniac libéré par l'aminoacide pour former la murexide, substance responsable de la coloration rouge pourpre observée. Dans la réaction ninhydrine-aminoacides, l'analogue de l'alloxantinne serait l'hydrindantine, substance facilement obtenue par réduction de l'hydrate de tricétohydrindène par l'hydrogène sulfuré [389] ou par l'acide dialurique [390] et qui donne également la coloration bleue avec les aminoacides. Dans le dernier article de cette série,



Hydrindantine.

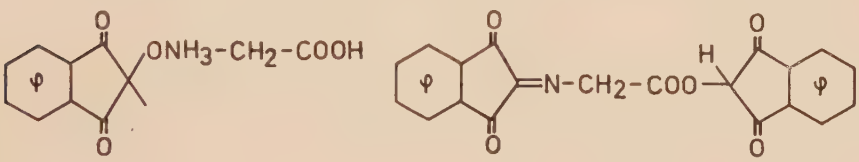


Sel d'ammonium de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine.

Ruhemann [391] suggère que cette coloration bleue est due à la formation du sel d'ammonium de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine (DYDA-NH_4), sel qu'il isole après action de l'alanine sur l'hydrate de tricétohydrindène et dont l'analogie avec la murexide apparaît nettement sur les formules ci-dessus. L'action de la ninhydrine sur les aminoacides rentre dans le cadre plus général de la « Réaction de Strecker », terme que Schönberg et ses collaborateurs [414, 415] consacrent à la dégradation des aminoacides en aldéhydes ou en

cétones possédant un atome de carbone de moins. Si Ruhemann a bien remarqué la formation de la DYDA-NH_4, la décarboxylation de l'acide aminé et la formation d'aldéhyde, il ne donne dans ses mémoires aucune séquence réactionnelle : c'est que les processus d'apparition de la coloration sont loin d'être simples et que plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

La plupart des auteurs admettent, avec Ruhemann, que le pigment bleu est bien constitué par le sel d'ammonium de la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine. Retinger avait cru pouvoir rapporter la coloration à l'existence d'un radical libre, de structure analogue à celle qu'il propose pour les sels colorés que fournit l'hydrindantine en milieu fortement alcalin [371] ; cette conception a été battue en brèche par Mac-Fadyen et Fowler [284] qui démontrent, par la spectrophotométrie, la différence de constitution entre le pigment formé par l'action de la ninhydrine sur les aminoacides et celui donné par les sels alcalins de l'hydrindantine. La réalité du produit de condensation admis par Ssadikov et Zelinsky [436] n'a pu être davantage confirmée ultérieurement.



I II

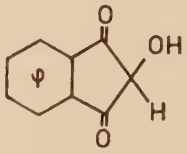
Produits colorés hypothétiques
obtenus par action de la ninhydrine sur le glycocolle.

I = selon Retinger.
II = selon Ssadikov et Zelinsky.

Les partisans de la DYDA-NH_4 s'opposent lorsqu'il s'agit d'expliquer la genèse de ce produit coloré. Certains auteurs admettent la formation d'hydrindantine comme composé intermédiaire; Ruhemann pense que ce composé prend naissance par combinaison de l'hydrate d'indanetrione avec un produit de réduction de cette tricétone, l'hydroxydicétohydrindène, encore appelée dicétoindanol ou hydroxy-2-indanedione-1,3 (*). L'hydrindantine, en effet, traitée par le carbonate

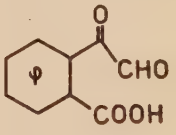
(*) On a d'ailleurs proposé la formation d'hydrindantine comme caractérisation du dicétoindanol, en traitant ce dernier composé par la ninhydrine [197].

d'ammonium, donne le sel d'ammonium de la DYDA [391, 188, 189].

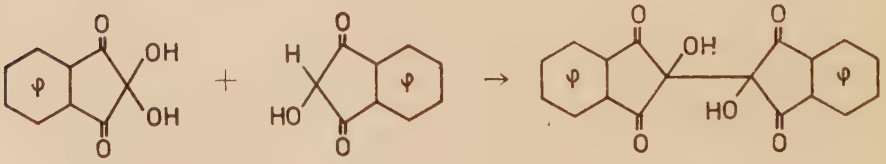


Dicétoindanol.

Les constatations de RUHEMANN furent bientôt confirmées par HALLE et coll. [179], mais aucun de ces chercheurs ne précise le mécanisme de formation de l'hydroxy-2-indanedione-1,3. Quelques années plus tard, RETINGER [371] admet que le premier temps de la réaction consiste en l'ouverture du cycle pentagonal de la ninhydrine qui se transforme en *o* - carboxyphénylglyoxal, composé dicarbonylé fortement réducteur, capable de réduire la ninhydrine non transformée en dicétoindanol; cet alcool secondaire, en présence de ninhydrine, donnerait ici encore l'hydrindantine, que RETINGER écrit sous sa forme pinacolique, qui semble confirmée par des travaux plus récents [313].



o-Carboxyphénylglyoxal.

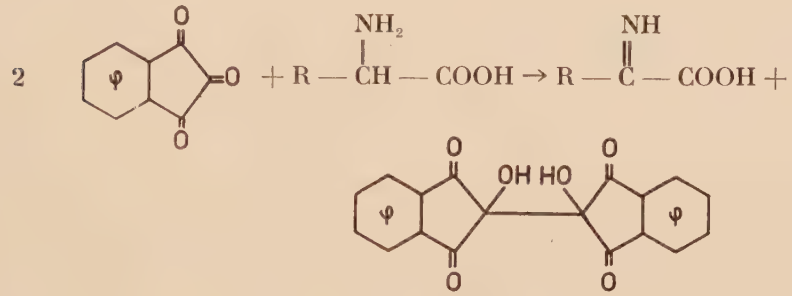


Ninhydrine. Dicétoindanol. Hydrindantine (forme pinacolique).

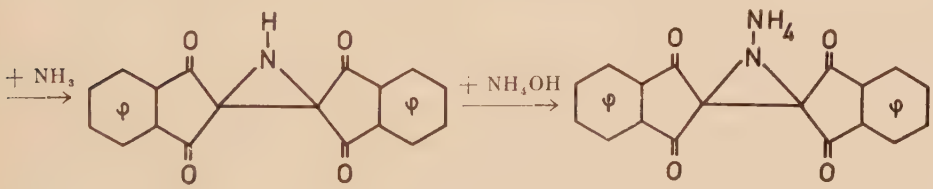
Nous devons à ABDERHALDEN d'avoir isolé pour la première fois l'hydrindantine des produits de réaction de la ninhydrine avec l'acide glutamique, l'alanine, la leucine et le glycocolle

[12] ; mais ce chimiste allemand pense que l'hydrindantine peut également provenir de la dégradation du colorant bleu.

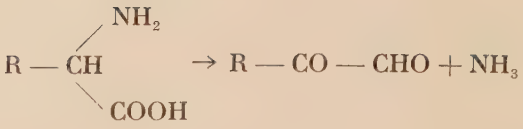
Citons encore l'hypothèse de Woker et Antener [515] ; ces chimistes suisses admettent aussi la formation d'hydrindantine, par deshydrogénation de l'acide α-aminé, transformé en acide α-iminé :

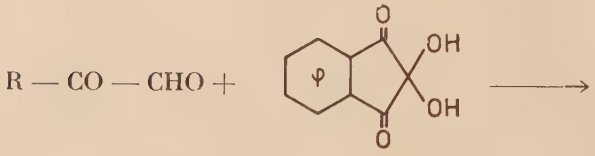


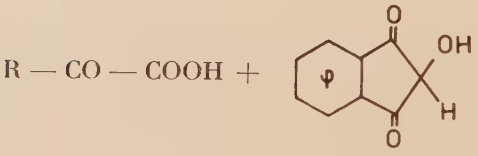
La formation du composé bleu proviendrait de l'action de l'ammoniaque, libérée par hydrolyse de l'acide α-iminé.



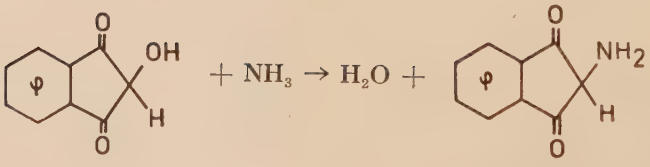
D'autres auteurs admettent, au contraire, que la réaction colorée se développe sans que l'hydrindantine prenne naissance. Harding et Warneford [189] envisagent la désamination de l'aminoacide en glyoxal, selon la conception de Dakin et Dudley [106] ; ce glyoxal réduirait la ninhydrine en dicétoindanol et cet alcool réagit sur l'ammoniac libéré pour former la dicéto-1,3-indamine-2 ou dicétohydrindamine; le passage à la DYDA nécessite ensuite l'intervention d'une nouvelle molécule de ninhydrine.



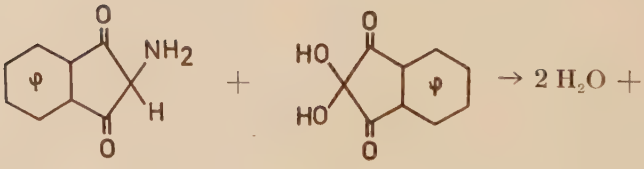


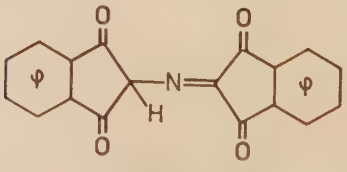


Dicétoindanol.



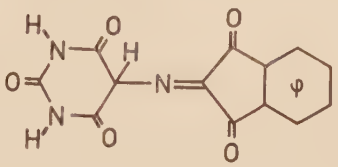
Dicétohydrindamine.





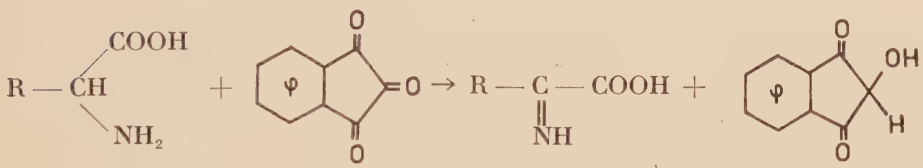
DYDA.

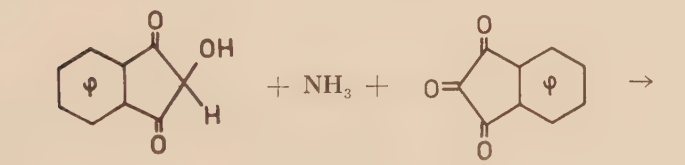
Remarquons à ce sujet que RUHEMANN avait déjà signalé l'apparition de la DYDA au cours de l'oxydation de la dicétohydrindamine [391]; de plus, cet auteur a montré que la ninhydrine peut réagir avec l'uramile, homologue de la dicétohydrindamine dans la série de l'alloxanne, pour donner un composé correspondant à la formule ci-dessous, composé dont le sel de potassium est également coloré en rouge-violet [391].

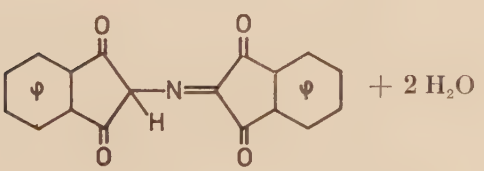


Cette structure représente un hybride entre celle de la murexide et celle de la DYDA.

Le passage par la dicétohydrindamine n'est pas retenu par GRASSMAN et ARNIM [167] qui admettent la suite de réactions ci-dessous :







Le mécanisme de la réaction de la ninhydrine avec les aminoacides a donné lieu ces dernières années à plusieurs publications d'intérêt majeur. En 1948, Moore et Stein [302] identifient à nouveau le pigment à la dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine. Deux ans plus tard, MacFadyen [283] réaffirme que la coloration est bien conditionnée par l'apparition de l'anion correspondant à la DYDA, anion auquel il donne le nom de pourpre de Ruhemann; en collaboration avec Nathalie Fowler [284], il émet des critiques pertinentes sur les théories antérieures : la formation du pourpre de Ruhemann, à partir de la ninhydrine ou de l'hydrindantine, est plus rapide avec les aminoacides qu'avec les sels d'ammonium; or, les conceptions de Ruhemann, celles de Harding et coll. comme celles de Grassman et Arnim supposent le passage par l'ammoniac et méritent d'être revisées sur ce point. Le mécanisme proposé par Harding et coll. n'explique pas pourquoi l'acide aminé se transforme en un glyoxal et de plus, l'acide α-cétonique formé ultérieurement ne peut rendre compte de la vitesse de libération du gaz carbonique : Van Slyke, Dillon, MacFadyen et Hamilton [479] ont montré en effet que la décarboxylation des acides α-cétoniques est bien plus lente que celles des aminoacides. Un nouveau schéma doit donc être adopté; MacFadyen [284] a pu prouver que dans la réaction de l'alanine sur l'hydrindantine, il convenait d'envisager le passage par l'intermédiaire de l'indanone-ènediol, forme énolique du dicétoindanol; la disparition de ce composé se montre en effet proportionnelle à la formation du pourpre de Ruhemann; le mécanisme détaillé de la réaction à partir de la ninhydrine est annoncé pour une publication ultérieure, mais nous n'en avons pas trouvé mention dans la littérature.

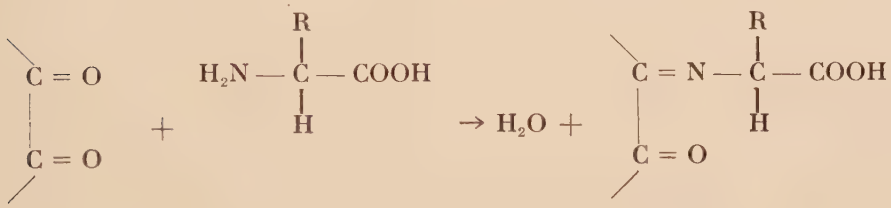
Près de trois ans avant la publication du biochimiste américain, une équipe de l'Université Fouad du Caire, sous la direction de Schönberg [415], avait proposé une nouvelle interprétation de la réaction de Strecker qui rend mieux compte des faits connus; les seules substances capables de dégrader ainsi un aminoacide doivent présenter dans leur molécule le groupement :

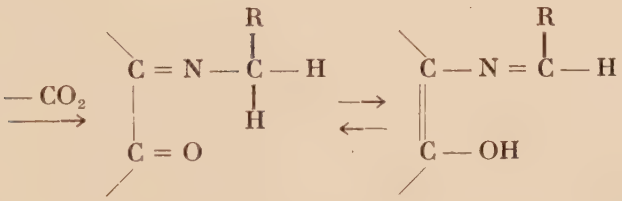
$$— CO — [CH = CH]_n — CO —$$

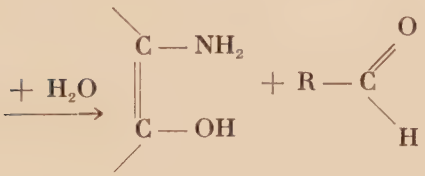
dans lequel n peut être égal à zéro, comme c'est le cas de la ninhydrine qui nous intéresse. Les schémas qui ne tiennent pas compte de cette remarque ne peuvent être admis; dans

la suite de réactions adoptée par GRASSMANN et ARNIM par exemple, la ninhydrine ne joue que le rôle d'une substance deshydrogénante et cependant le passage à l'aldéhyde ne peut être obtenu avec des corps plus avides d'hydrogène, comme l'azobenzène ou le bleu de méthylène.

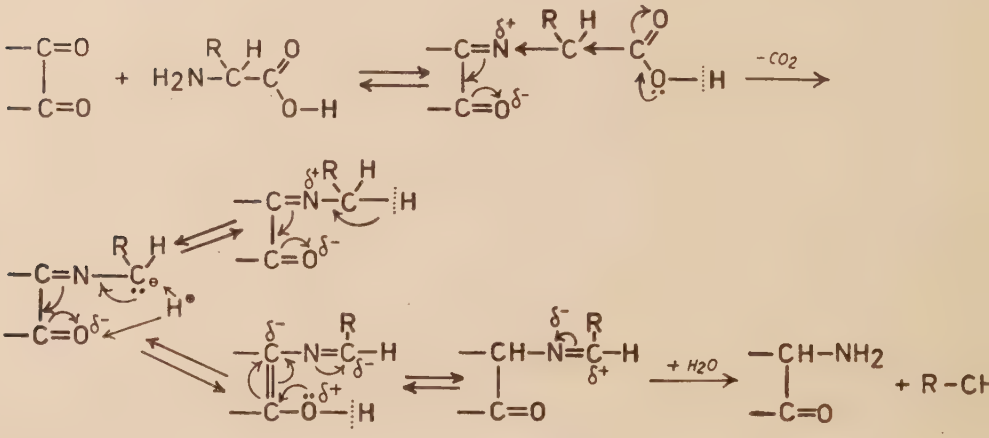
La première étape consisterait en la formation d'une base de Schiff, qui se décarboxyle ultérieurement pour donner une molécule en résonance entre deux structures extrêmes dont l'une conduit à l'aldéhyde par hydrolyse :





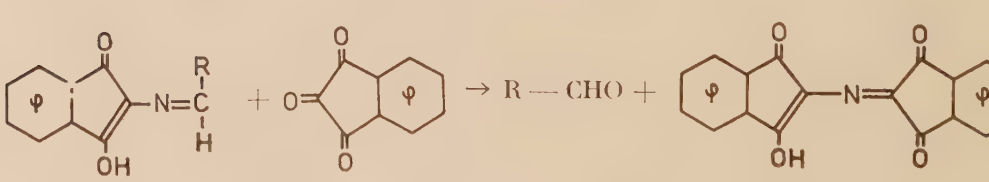


La conception de Schönberg et coll. a été confirmée par l'interprétation électronique de Baddar [26], qu'illustrent les formules ci-dessous :



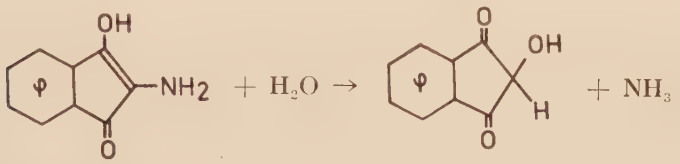
Le déplacement mésomérique des électrons débute dans le groupement carbonylé de la base de Schiff, amenant sur l'atome d'azote une charge positive qui favorise la décarboxylation. Le proton détaché de l'ancien groupement carboxylique peut se fixer sur l'un ou l'autre des deux centres négatifs, carbone ou oxygène, pour donner les deux structures de résonance figurées ci-dessus.

La formation du pourpre de Ruhemann s'effectuerait alors, comme le suggère Yamagishi [520], à partir de la forme énolique de la base de Schiff décarboxylée :

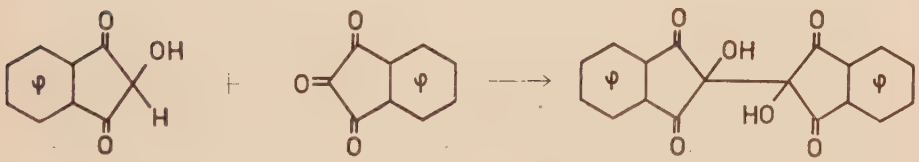


Il convient de souligner que, dans la séquence réactionnelle proposée par Schönberg et coll. et ainsi complétée par Yamagishi, les produits de réduction de la ninhydrine, hydrindantine et hydroxydicétohydrindène, ne trouvent pas place. On ne peut nier cependant, comme nous l'avons dit plus haut, la formation d'hydrindantine.

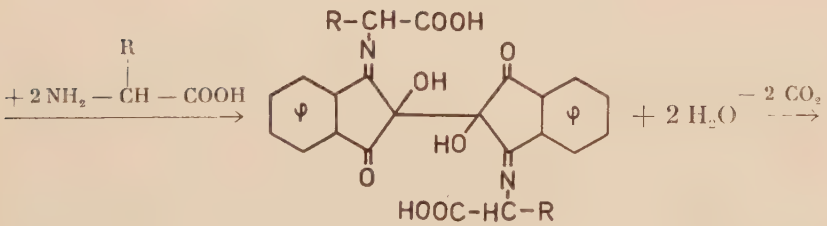
La conception de Schönberg ne représenterait qu'une des modalités de la réaction, et ses collaborateurs Moubasher et Ibrahim [311] ont montré que d'autres réactions pouvaient évoluer parallèlement; ces auteurs ont pu isoler de la réaction ninhydrine-alanine un produit violet cristallisé en aiguilles, fondant à 297° C., non azoté, qu'ils identifient à la bis-dicéto-indanyle; ce composé se formerait selon les réactions :

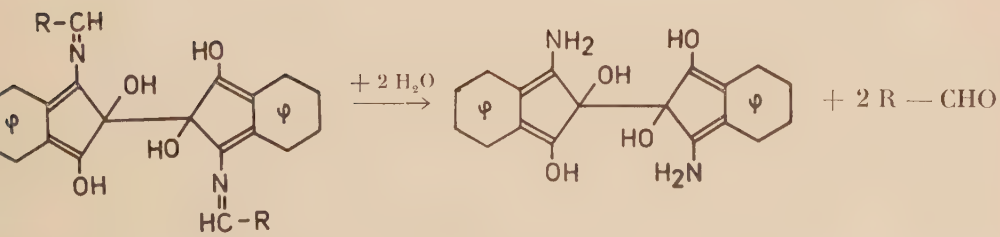


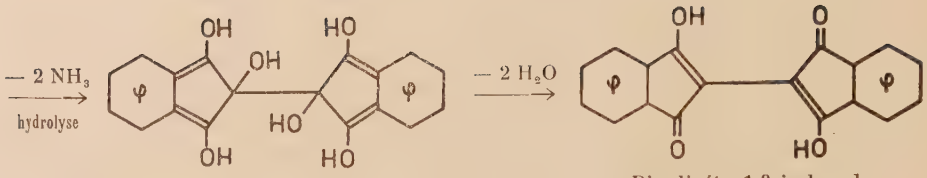
Dicétohydrindamine
(forme énolique).



Hydrindantine
(forme pinacolique).



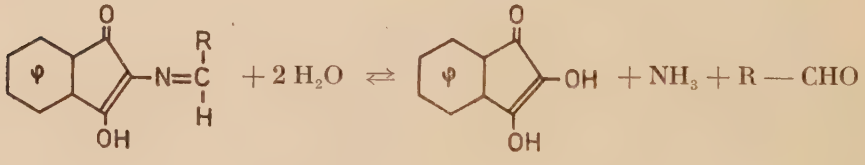




Bis-dicéto-1,3-indanyle.

La présence de la bis-dicétoindanyle a été confirmée récemment par Yamagishi [522], lorsque la réaction s'effectue dans un tampon de *p*H = 5; ce composé coloré ne prendrait pas naissance quand la réaction est conduite en présence de pyridine.

Le rôle favorisant que manifestent divers agents réducteurs, chlorure stanneux [302, 431], cyanure de potassium [469, 530], acide ascorbique [461, 526], dans la réaction colorée ninhydrine-aminoacides peut être interprété par la transformation partielle de la tricétone en hydrindantine dont nous venons de souligner encore le rôle; mais il est possible également de penser, avec Yamagishi [522], que l'agent réducteur, par formation d'indanone-ènediol, s'opposerait à l'hydrolyse de la base de Schiff en modifiant vers la gauche l'équilibre suivant :



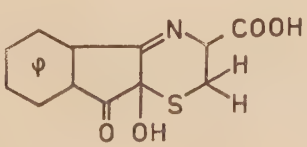
Les lignes précédentes ont montré la complexité du mécanisme de réaction de la ninhydrine sur les aminoacides : aucune théorie n'est encore pleinement satisfaisante; il est probable d'ailleurs que, selon la valeur du *p*H, la concentration des réactifs mis en jeu, le pouvoir réducteur du milieu, l'une des réactions possibles prend une place prépondérante sur les autres et que même, dans des conditions expérimentales bien déterminées, plusieurs réactions se déroulent simultanément.

II. — SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION

Ruhemann [389] avait noté qu'il n'est pas possible d'obtenir de coloration bleue en chauffant une solution de ninhydrine avec des dérivés de substitution du glycocolle, aussi bien au niveau de la fonction amine (acide hippurique) qu'au niveau de la fonction carboxylique (glycocollate d'éthyle) : il semblait donc que cette réaction chromatique soit caractéristique du groupement acide α-aminé, d'autant plus que les β-amino-acides examinés par ce chercheur ne fournissaient qu'une réaction très faible. Sa conception est soutenue par Abderhalden et Schmidt [10] : la coloration bleue n'est observable qu'avec des composés dont le groupement aminé primaire *libre* est voisin d'un groupement acide également *libre;* cette condition *nécessaire* n'est cependant pas *suffisante,* car plusieurs acides α-aminés donnent avec la ninhydrine une réaction chromatique atypique. De nombreux auteurs ont de plus montré, par la suite, que la coloration bleue pouvait être obtenue avec d'autres substances : sels d'ammonium, amines, protéines et leurs produits d'hydrolyse et même avec des substances non azotées. Quelle est donc la spécificité de la réaction colorée avec la ninhydrine ?

Réaction colorée atypique de la ninhydrine avec certains acides α-aminés

Les acides α-aminés qui possèdent dans leur molécule une autre fonction capable de réagir avec la ninhydrine, manifestent certaines particularités dans leur comportement vis-à-vis de la tricétone. C'est spécialement le cas de certains acides aminés soufrés. Si la cystine fournit la coloration bleue classique [10], bien que d'une manière non quantitative [186], la cystéine, au contraire, donne une coloration dont le spectre d'absorption apparaît nettement différent de celui des autres aminoacides [302]. Ceci semble en rapport avec la formation d'un produit de condensation entre la cystéine et l'hydrate d'indanetrione, produit isolé par Kuhn et Hammer [249], et dont la structure correspond à la formule ci-dessous :



La réactivité de la ninhydrine avec les groupements thiol a d'ailleurs été invoquée pour expliquer certaines propriétés biochimiques de ce réactif [66, 163, 171, 370, 456].

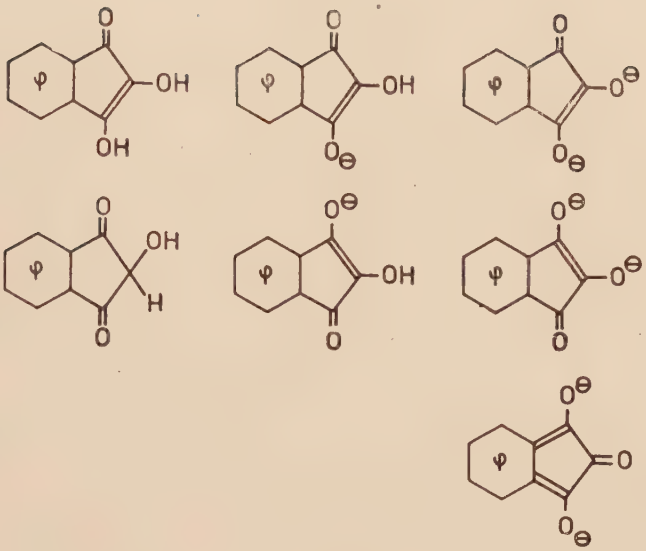
On peut rapprocher du cas de la cystéine celui de certains α-aminoacides hétérocycliques : tandis que la β-(pyridyl-2)-alanine et la β-(pyridyl-3)-alanine donnent la réaction bleue classique, la β-(pyridyl-4)-alanine fournit une coloration rouge [329 a].

D'autre part, l'amide de l'acide aspartique ou asparagine [389], certains diaminomonoacides comme la citrulline, des composés iodés comme la mono-, la diiodotyrosine et la thyroxine, des aminoacides hétérocycliques comme l'histidine donnent en solution ou sur les chromatogrammes des réactions colorées différentes des aminoacides plus simples [116].

Réaction colorée de la ninhydrine avec des substances non azotées

Halle, Loewenstein et Pribram [179] ont obtenu une coloration bleue ou rouge en chauffant la ninhydrine en milieu alcalin avec de nombreuses substances : glycéraldéhyde, lévulose, glucose, glycérine, ...; comme il s'agit toujours de substances réductrices, les auteurs admettent que les colorations observées, différentes de celles données par les aminoacides, sont analogues à celles fournies par l'hydrindantine en milieu alcalin; ce produit donne en effet, avec du carbonate de sodium, une coloration rouge, tandis qu'en milieu plus basique, on observe une teinte bleue [389, 390] ; ces teintes, selon Mac-Fadyen et Fowler [284], ne seraient pas dues aux sels d'hydrindantine, mais à différents anions colorés de l'indanone-ènediol. Les observations de Halle et coll. n'ont cependant pas été confirmées par Harding [185].

Signalons encore quelques réactions colorées en milieu sulfurique dont le mécanisme n'a pas été élucidé : réaction bleu rouge avec le propionaldéhyde, dans des conditions où les aminoacides ne donnent aucune coloration [223]; réactions colorées avec différents stérols, pouvant être appliquées au dosage de la testostérone [256] et de la désoxycorticostérone [288].



Jaune pâle. Rouge. Bleu.

Formes colorées de l'indanone-ènediol
(selon MacFadyen et Fowler [284]).

Réaction de la ninhydrine avec les sels d'ammonium

Nous avons longuement développé plus haut l'action de l'ammoniaque sur la ninhydrine. Si les colorations rouges ainsi observées ne prêtent guère à confusion avec la coloration fournie par les aminoacides, il n'en est pas de même des sels d'ammonium. Rappelons d'ailleurs que Ruhemann a montré la formation de la DYDA-NH_4 par chauffage de l'hydrindantine avec le carbonate d'ammonium. Aussi les problèmes soulevés par l'action des ions ammonium ont-ils été examinés ultérieurement par plusieurs chercheurs.

Abderhalden et Schmidt [10] signalent une coloration rouge avec l'ammoniaque et le carbonate d'ammonium, tandis que l'acétate et l'oxalate ne leur donnent aucune réaction colorée. Ces derniers essais ne furent confirmés ni par Neuberg [316, 317], ni par Herzfeld [204], pas plus que par Halle, Loewenstein et Pribram [179], et incitèrent Harding et Warneford à effectuer une étude systématique [189] dont ces auteurs tirent les conclusions suivantes :

— Dans certaines conditions, les sels d'ammonium donnent

effectivement naissance au même produit coloré que les acides α-aminés, la DYDA-NH_4;

— A la concentration de 1 p. 100, les sels d'ammonium des acides faibles donnent une réaction positive;

— Les sels des acides forts minéraux ne réagissent qu'à des concentrations supérieures;

— La pyridine augmente la sensibilité de la réaction sels d'ammonium-ninhydrine comme celle de la réaction amino-acides-ninhydrine;

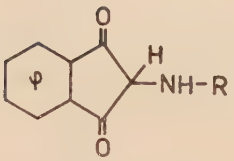
— Les substances réductrices présentent également un effet favorisant.

Ces conclusions ont été confirmées depuis à plusieurs reprises [372, 41, 302]. Il est admis maintenant que les sels d'ammonium réagissent avec la ninhydrine en milieu légèrement alcalin, l'alcalinité étant amenée par le sel minéral lui-même ou par un apport extérieur (pyridine).

Dans les techniques récentes de détermination colorimétrique des aminoacides, effectuées avec un tampon citrate de *p*H = 5 [302] ou un tampon acétate de *p*H = 5,5 [305], l'ammoniac ne réagit qu'en présence d'un agent réducteur, c'est-à-dire, en définitive, d'hydrindantine. Aussi est-il nécessaire d'éviter toute contamination par l'ammoniac si fréquemment rencontré dans l'atmosphère des laboratoires [302, 241, 243]. Il est même possible d'effectuer le dosage de l'ammoniaque par la ninhydrine [143].

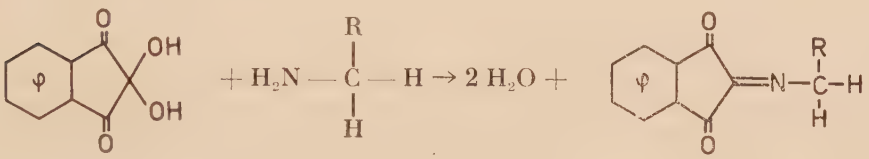
Réaction de la ninhydrine avec les amines

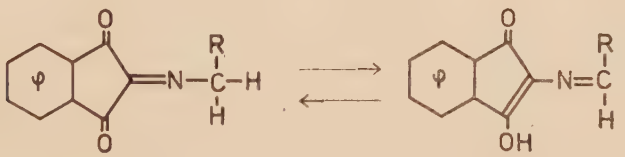
Neuberg, le premier, dès 1913 [316], apporte la preuve qu'un grand nombre d'amines se comportent avec la ninhydrine d'une manière voisine de celle des aminoacides en donnant également un pigment bleu; il étend ses observations aux aminoaldéhydes et aux acides aminosulfoniques [316, 317]; la réactivité de ces derniers a été confirmée ultérieurement [470 a]. La réaction de l'hydrate d'indanetrione avec les amines est expliquée par Harding [184] et Harding et MacLean [188] en admettant l'hydrolyse du réactif en acide *o*-phénylglyoxalcarboxylique, produit réducteur qui amènerait la formation dans le milieu de dicéto-1,3-hydrindanol; cette substance se combinerait alors à l'amine pour donner une dicétohydrindamine substituée :



qu'une nouvelle molécule de ninhydrine transforme en pourpre de Ruhemann.

Les conceptions modernes sur la réaction de la ninhydrine avec les aminoacides nous permettent d'interpréter, tout au moins partiellement, le mécanisme de son action sur les amines. Tous les auteurs semblent être d'accord sur la formation initiale d'une base de Schiff [415, 312, 520, 521], suivie d'un remaniement provenant de la migration d'un atome d'hydrogène :

(A) 

(B) 

Ce dernier composé, ou bien formerait directement le pourpre de Ruhemann par action d'une nouvelle molécule de ninhydrine [520, 521], ou bien s'hydrolyserait en dicéto-1,3-hydrindamine [415], précurseur du pourpre du Ruhemann, ou bien encore se transformerait en hydroxy-2-dicétohydrindène, puis en hydrindantine, dont le sel double obtenu avec l'excès d'amine serait responsable de la coloration bleue [312, 313].

La formation de la base de Schiff (réaction A) implique la participation d'une amine primaire; on a remarqué en effet que les amines secondaires [108] et tertiaires [108, 312] étaient inertes vis-à-vis de la ninhydrine. L'adrénaline [523], la sarcosine [10, 523], l'éphédrine [335, 496] et la méthylbenzylamine [448] donnent cependant une coloration bleue

avec l'hydrate de tricétohydrindène, mais YAMAGISHI [523] a montré que les amines secondaires n'agissent que pour autant qu'elles s'hydrolysent au cours de la réaction en libérant une amine primaire : l'éphédrine, par exemple, fournit de la méthylamine, puisqu'on décèle du méthanal dans le milieu réactionnel.

La réaction (B), d'autre part, n'est certainement possible que si l'amine initiale possède au moins un atome d'hydrogène sur son carbone en α. Les amines les plus réactives sont celles du type $R - CH_2 - NH_2$, sauf toutefois les composés substitués en β par un groupement carbonylé, de formule :

$$R - CO - CH_2 - NH_2,$$

comme l'α-aminodihydroxy-3,4-acétophénone [108].

Les amines de formule générale $(R_1,R_2)CH - NH_2$ peuvent encore réagir, mais la formation d'une base de Schiff avec la tricétone [525] ou bien la migration de l'hydrogène dans cette dernière base apparaît plus difficile : l'isopropylamine, en effet, contrairement aux résultats de HARDING et MACLEAN [188], réagit avec la ninhydrine, mais plus faiblement que le composé non ramifié (*). Les α-aminoacides rentrent dans cette catégorie, mais la présence du groupement carboxylique augmente la mobilité de l'hydrogène. Quand le groupement carboxylique s'éloigne du groupement amine primaire, la réactivité diminue : les acides β-aminés, les γ- ou les ε-aminoacides donnent avec la ninhydrine une réaction colorée plus faible mais cependant nette : on peut ainsi doser l'acide pantothénique en évaluant la β-alanine qu'il libère à l'hydrolyse [527] ; ces aminoacides ne subissent cependant ni décarboxylation totale [479], ni désamination totale [99, 102]. Signalons encore la réaction bleue obtenue avec la glucosamine [312].

Le schéma réactionnel précédent a pu être confirmé par l'isolement, à partir de l'éthylamine, de la butylamine et de la benzylamine, des aldéhydes correspondants ainsi que d'hydrindantine [312].

Les amines aromatiques [108], les amides [188] ou les amines du type $(R_1,R_2,R_3)C - NH_2$ ne donnent plus de réaction colorée, sauf toutefois s'il s'agit d'un α-aminoacide de formule $(R_1,R_2)\,C(NH_2)COOH$, dont la décarboxylation amènera la

(*) Quand la ramification de la chaîne est plus éloignée de la fonction amine, la réactivité augmente : l'isobutylamine donne plus facilement la coloration que l'isopropylamine et l'isoamylamine ne se distingue plus de l'homologue linéaire [345] ; dans le cas de l'isobutylamine, on peut isoler, après action de la ninhydrine, la méthyléthylcétone [312].

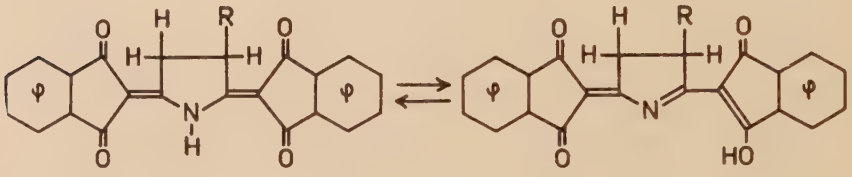
migration d'un atome d'hydrogène sur l'atome de carbone; c'est ce que l'on observe avec l'isobutalanine [389, 525]. Avec les amines aromatiques, nous l'avons vu, il est cependant possible d'isoler, au sein d'un liquide coloré, la base de Schiff cristallisée [387, 308], qui se montre d'ailleurs fort instable.

Certaines amines qui entrent, selon les données ci-dessus, dans le cadre des amines réactives, ne donnent cependant pas de pourpre de Ruhemann lorsqu'on les révèle sur les chromatogrammes avec la ninhydrine; on peut penser que les colorations observées, souvent très éloignées de celle du pourpre de Ruhemann [116, 57, 108, 345], sont dues à la simple base de Schiff; la réaction n'aurait pas dépassé ce stade en raison de l'insolubilité de la base de Schiff ou de sa stabilisation à la suite de son adsorption sur la cellulose. Notons d'ailleurs que cette base de Schiff a pu être parfois isolée [520, 521] et qu'elle réagit secondairement avec la ninhydrine pour donner le pourpre de Ruhemann [520], ou qu'elle se décompose dans d'autres conditions expérimentales en hydrindantine et en bis-dicétoindanyle [521]. La décomposition du pourpre de Ruhemann semble également responsable des modifications spectrophotométriques observées par Perry et Goldstein [345] au cours du vieillissement des milieux où l'on a effectué la réaction amines-ninhydrine.

Les diamines aliphatiques méritent une mention particulière; leur réactivité, déjà signalée par Neuberg [316] et par Moubasher et Othman [312], a fait l'objet récemment d'investigations quantitatives [524]; si l'octo- et la décaméthylène diamine donnent toutes deux la quantité de pigment calculée en tenant compte des deux groupes $-NH_2$, la putrescine (tétraméthylène diamine), la cadavérine (pentaméthylène diamine) et l'hexaméthylène diamine ne donnent pas plus de coloration qu'une monoamine. Yamagishi pense que ce comportement résulte d'une cyclisation, provenant de la formation d'une base de Schiff interne entre le groupement carbonylé libéré et la fonction amine qui n'a pas encore réagi : cette conception est étayée par l'absence de la réactivité du γ-aminobutyraldéhyde avec la ninhydrine, tandis que l'acétal correspondant fournit la quantité escomptée de pourpre de Ruhemann; l'éthylène diamine, qui ne donne pas non plus de colorant bleu, formerait avec la tricétone la benzoylène-2,3-dihydro-5,6-pyrazine.

Réaction de la ninhydrine avec les acides α-iminés

Les acides iminés manifestent une réactivité particulière : Abderhalden et Schmidt [10] signalèrent, dès 1911, l'obtention, avec la proline et l'hydroxyproline, de teintes respectivement jaune et rouge. Ce n'est toutefois qu'en 1934 que Grassmann et Arnim montrèrent que les deux iminoacides fournissent, après une coloration jaune passagère, une coloration rouge; ils purent isoler le colorant rouge, auquel ils attribuèrent les structures ci-dessous, qu'ils confirmèrent bientôt [168].



I II

Composé obtenu avec la proline (R = — H).
Composé obtenu avec l'hydroxyproline (R = — OH).

La formation de ces produits implique une décarboxylation de la proline ou de l'hydroxyproline; le colorant rouge obtenu à partir de la proline se montre d'ailleurs identique à celui donné par la pyrrolidine [167] et prend naissance par action d'une deuxième molécule de ninhydrine sur le colorant jaune qui serait constitué par la monopyrrolidinyl-ninhydrine (voir plus haut, p. 37). Le mécanisme d'action de la ninhydrine sur la proline et l'hydroxyproline se confirme par le fait que ces substances libèrent effectivement la quantité théorique de gaz carbonique sous l'influence de la tricétone [479, 181, 430], tandis qu'on ne peut déceler que des quantités d'ammoniac nulles [281] ou en tout cas minimes [433, 404, 181, 99, 102]. De nombreux travaux, consacrés à la détermination quantitative de ces acides α-iminés ou à leur révélation sur les chromatogrammes ont montré la complexité de l'action de la ninhydrine.

Comme l'ont bien noté Grassmann et Arnim [167], le premier temps de la réaction consisterait bien en la formation d'une monopyrrolidinyl-ninhydrine [470], dont nous avons déjà donné les structures possibles (voir p. 37). Lorsqu'on

opère dans l'acide acétique froid, la réaction s'arrête à ce stade, caractérisé par un maximum d'absorption à 350 mμ; notons que les divers acides pyrrolidine α-carboxyliques fournissent le même spectre, mais manifestent une réactivité différente, l'allohydroxyproline réagissant plus vite que l'hydroxyproline, plus rapide elle-même que la proline [351].

Le composé disubstitué formé par l'action de la deuxième molécule de ninhydrine possède une structure en rapport avec les modalités qui ont présidé à sa préparation :

1° En milieu neutre (tampon phosphate de *p*H = 7), les colorants obtenus avec la proline et l'hydroxyproline, insolubles dans l'eau mais extractibles par le benzène, présentent dans ce dernier solvant un maximum d'absorption à 550 et 570 mμ respectivement; on remarque ici encore la réactivité plus forte de l'hydroxyproline par rapport à la proline [469]. La structure du colorant obtenu en milieu neutre correspond vraisemblablement à la formule cétonique de Grassmann et Arnim [470] (I, p. 58).

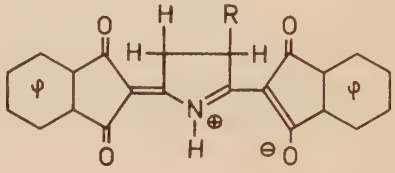
2° En milieu acide et à chaud, le composé rouge obtenu avec la proline possède un spectre légèrement différent, puisque son maximum d'absorption se trouve décalé vers les plus faibles longueurs d'ondes par rapport aux composés préparés en milieu neutre; les différents auteurs donnent les chiffres de 510 mμ [351, 427], de 515 mμ [81, 470] ou de 530 mμ [421]. Les propriétés des produits rouges obtenus en milieu acide s'expliquent en admettant la structure énolique de Grassmann et Arnim (II, p. 58) : sous l'influence d'un alcali, ils se transforment en produits bleus (maximum d'absorption à 630 mμ), insolubles dans le benzène mais solubles dans les solvants polaires [470].

Les colorants obtenus par Grassmann et Arnim [167] en milieu neutre sembleraient faire exception puisque leur maximum d'absorption est noté à 520 mμ pour la proline et à 549 mμ pour l'hydroxyproline, mais il convient de remarquer que ces chimistes ont effectué leurs mesures spectrophotométriques avec des solutions acétiques.

Le fait que l'ornithine donne le même colorant rouge que la proline par action de la ninhydrine en milieu acide [81] doit s'expliquer probablement par la cyclisation du diaminomonoacide; Schweet remarque d'ailleurs [421] qu'en dehors de l'acide pipécolique (voir ci-dessous), l'ornithine et la citrulline, toutes deux facilement cyclisables, sont les substances qui interfèrent le plus dans le dosage de la proline.

Les deux formes, cétonique et énolique, du colorant rouge

ne suffisent d'ailleurs pas à expliquer la totalité des phénomènes connus. Lors de la révélation de l'hydroxyproline sur les chromatogrammes, une fraction du colorant rouge, fortement fluorescente et présentant un maximum d'absorption à 570 mμ, n'est pas extractible par les solvants polaires ou apolaires; Clarkson [87] lui assigne la structure III, qui



III

serait stabilisée par adsorption sur la cellulose, l'action de ce polyholoside étant assez spécifique puisque ni le papier acétylé, ni l'amidon, le dextrane, le cellobiose ou différents oses ne donnent lieu au même phénomène.

Quelle que soit la structure des composés rouges, ils semblent assez instables : Troll et Cannan [469] remarquent qu'en solution aqueuse neutre la coloration vire rapidement au jaune (maximum d'absorption à 440 mμ), surtout lorsque la réaction a été effectuée avec la proline. C'est également cette longueur d'onde de 440 mμ que Moore et Stein [302, 305] utilisent pour le dosage de la proline et de l'hydroxyproline. Lorsqu'on opère au contraire en milieu acide, les pigments fournis par l'hydroxyproline apparaissent particulièrement fragiles [470, 351]. La structure des produits de décomposition n'a pas encore été précisée.

L'acide pipécolique, homologue de la proline dans la série de la pipéridine, manifeste un comportement très voisin de l'acide pyrrolidine α-carboxylique [167, 168, 421]. Le colorant obtenu possède un maximum d'absorption situé par différents chercheurs à 554 mμ [167], 560 mμ [421], 565 mμ [351], 575 mμ [427]; malgré l'interférence avec la proline, l'évaluation quantitative des deux iminoacides dans un même mélange est rendue possible par l'emploi de petites quantités d'acide chlorhydrique ou sulfurique qui favorisent la réaction chromatique de la proline, tandis qu'elles inhibent celle fournie par l'acide pipécolique [421].

La coloration que donne la ninhydrine avec la baïkiaïne est nettement différente de celle de l'acide pipécolique [172]; d'ailleurs les maximums d'absorption obtenus avec l'acide

hydroxy-5-pipécolique et la baïkiaïne (voir p. 36) sont respectivement de 350 et de 395 mμ [351].

Réaction de la ninhydrine avec les peptides

Les peptides, qui possèdent au moins une fonction aminée libre, doivent également réagir avec la ninhydrine : c'est bien ce qu'ont noté les anciens auteurs [10, 11, 153, 187, 389] avec divers produits obtenus par hydrolyse des protéines. Des résultats plus précis ont été donnés par Cherbuliez et Herzenstein [77] qui démontrent la réactivité de la glycylglycine, de la diglycylglycine et de la triglycylglycine. En réalité, leurs constatations ne peuvent être généralisées, car seuls les glycylpeptides, dont le carbone en α du groupement aminé possède deux atomes d'hydrogène libres, fournissent avec la ninhydrine une coloration importante [12, 41, 354] et se montrent susceptibles d'être désaminés quantitativement [100, 101, 395] ; ces constatations ne sont d'ailleurs pas admises par tous les auteurs [120]. Notons en outre que le colorant qui prend naissance dans la réaction peptides-ninhydrine est bien la DYDA, comme l'ont prouvé Moore et Stein [302]. Les peptides offrent d'ailleurs des surprises à l'expérimentateur : Yanari [528] vient de montrer en effet que, dans certaines conditions opératoires, la L-leucyl-L-leucine fournit une coloration plus forte que les glycylpeptides, et que, d'autre part, les deux diastéréoisomères de la leucyl-L-tyrosine ont une réactivité nettement différente vis-à-vis de la ninhydrine.

Réaction de la ninhydrine avec les protéines

C'est en raison de leur structure peptidique que les protéines réagissent également avec la ninhydrine en donnant une coloration bleue (*), comme l'avait déjà vu Ruhemann [389] en 1911 : d'après ce que nous savons maintenant de la réactivité de la ninhydrine, la tricétone attaque électivement les extrémités aminées des chaînes peptidiques (notamment si le groupement aminé appartient à une molécule de glycocolle) et les groupements ω-aminés des diaminoacides. Il n'est pas certain que l'hydrate de tricétohydrindène ait son action limitée aux seules fonctions aminées : les groupements thiol

(*) L'insuline à *p*H = 7 donnerait toutefois une coloration rouge [440], peut-être en rapport avec la présence d'aminoacides soufrés dans ce composé; Moubasher et Othman [312] signalent cependant l'obtention d'une coloration bleue et d'hydrindantine.

[66, 456, 370], selon toute vraisemblance, entrent également en jeu.

Dulière [123, 125] a signalé le premier que les protéines traitées par la ninhydrine acquièrent une sensibilité particulière vis-à-vis des acides, qui les précipitent, la réaction étant réversible; les protéines ainsi modifiées ne réagissent plus avec le formol. Des constatations analogues ont été effectuées par Eggerth [131] qui note en outre que les protéines traitées sont plus facilement précipitées de leur solution aqueuse par les sels neutres et qu'elles ne sont plus coagulables à l'ébullition pour un *p*H supérieur à 5,5; la ninhydrine semble s'être réellement fixée sur la protéine et sa liaison n'apparaît pas très stable puisque la protéine, traitée et dialysée, parfaitement incolore, redonne la coloration bleue par chauffage. L'action de la ninhydrine sur les groupements aminés entraînerait un abaissement du *p*H isoélectrique des protéines, d'où les modifications de leur comportement électrophorétique observées par M^lle^ Faure [137, 138]. Notons encore l'augmentation de résistance à l'allongement des fibres de kératine soumises à l'action de la ninhydrine [90], ainsi que l'action coagulante sur le fibrinogène. Ce dernier phénomène a été d'abord signalé par Chargaff et Ziff [76]; ces auteurs ont remarqué que la précipitation de la fibrine s'observait avant l'apparition de toute coloration; l'alloxanne et l'aldéhyde salicylique ont une action similaire mais moins marquée. Ferguson et Ralph [140] ont montré que la précipitation de fibrine ainsi obtenue ne pouvait être superposée à celle réalisée par la thrombine, les caillots obtenus ayant une morphologie microscopique tout à fait différente; la ninhydrine s'avère d'ailleurs pratiquement sans effet sur les mécanismes physiologiques de la coagulation sanguine. Chargaff et Bendich [75] ont montré ultérieurement que divers oxydants, dont la chloramine T, se montrent encore plus actifs sur le fibrinogène que la ninhydrine. Quoi qu'il en soit, la coagulation du fibrinogène par l'hydrate d'indanetrione a permis de mettre au point le dosage de cette protéine plasmatique [396] et l'évaluation quantitative de la thrombine [165].

L'amélioration de la panification provoquée par l'adjonction d'une petite quantité de ninhydrine à la farine [242, 506] provient vraisemblablement de l'action de la tricétone sur le gluten; rappelons à ce sujet le rôle des groupements sulfhydryles dans la panification [174].

La réaction colorée que donnent les protéines avec l'hydrate

d'indanetrione a donné lieu à quelques applications analytiques [428, 398, 399], mais les efforts des chercheurs se sont surtout portés sur les conséquences biologiques de la modification ainsi apportée aux protéines, conséquences que nous examinerons plus loin.

III. — APPLICATIONS ANALYTIQUES

La réaction de la ninhydrine avec les aminoacides a donné lieu à un nombre considérable de publications suscitées en majeure partie par la diffusion dans les laboratoires des techniques de chromatographie sur papier et de chromatographie sur colonne. Nous ne ferons que signaler les idées directrices qui ont conduit à l'élaboration de ces applications analytiques dont l'étude détaillée ne peut trouver place ici; nous examinerons également quelques applications analytiques de la ninhydrine à la détermination de substances apparentées aux aminoacides ou donnant lieu à des réactions voisines.

A. — Applications de la ninhydrine a l'analyse des aminoacides

Nous avons montré dans les pages précédentes que la ninhydrine réalise une « réaction de Strecker » lorsqu'elle réagit avec les aminoacides naturels; au cours de cette réaction, l'aminoacide est transformé en aldéhyde, tandis que l'on observe, outre la libération d'ammoniac et de gaz carbonique, la formation d'une coloration bleue. Ces différents points ont servi de base pour proposer divers procédés analytiques.

1° *Techniques fondées sur la détermination de l'aldéhyde*

Cette méthode est basée sur le travail d'Abderhalden [12], travail bientôt confirmé par Virtanen et coll. [490, 491, 492] et par Turba et coll. [471]; des techniques particulières ont été proposées pour le glycocolle [16, 246, 84, 419], pour l'alanine [489, 17], l'acide glutamique [368], la leucine [214], l'isoleucine [275, 214] et la méthionine [490, 265]; l'aldéhyde est habituellement distillé ou entraîné par la vapeur; la méthode de microdiffusion de Conway peut être également utilisée [419]. L'évaluation de l'aldéhyde s'effectue, selon les auteurs, par une réaction colorée [16, 17, 246], par chromatographie en phase gazeuse [214], ou se base sur la forma-

tion d'un dérivé bisulfitique [489, 490, 491, 492, 84, 419], ou du produit d'addition avec le dimédon [12, 257, 490], ou bien encore sur la transformation du composé carbonylé en dinitro-2,4-phénylhydrazone, dosée colorimétriquement [368] ou isolée par chromatographie [471, 265].

2° *Techniques fondées sur la détermination de l'ammoniac*

Pour une telle détermination, la réaction de la ninhydrine sur l'aminoacide s'effectue en milieu fortement acide, de manière à éviter toute formation de colorant; après alcalinisation par la soude, l'ammoniac est entraîné [405, 281, 433, 404] et dosé par acidimétrie ou par nesslérisation. A Montpellier, Cristol et ses élèves ont étudié récemment la cinétique du dégagement d'ammoniac avec les aminoacides [99, 102] et certains peptides [98, 100, 101].

3° *Techniques fondées sur la détermination de l'anhydride carbonique*

Cette méthode apparaît séduisante *a priori* puisqu'elle élimine obligatoirement l'interférence des amines qui réagissent également avec la ninhydrine en libérant de l'ammoniac.

Initialement proposée par Van Slyke et Dillon en 1936 [477], qui utilisent leur appareil de dosage du carbone organique [484], cette technique a été parfaitement mise au point par l'équipe du Rockefeller Institute [478]; le dosage du gaz carbonique s'effectue par gazométrie [479], par manométrie [403] ou par titrimétrie [482]. La méthode a été appliquée au sang [183], à l'urine [483] et à la détermination particulière de la glutamine [180]; elle se montre supérieure au dosage colorimétrique par le β-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium [82].

Des méthodes très voisines ont été décrites par Mason [290], Christensen et coll. [83] et par Smith et Aziga [430]. Dans les évaluations volumétriques, l'interférence des aldéhydes volatils est facilement éliminée par l'emploi de l'hydrazine [416].

Signalons enfin le travail de Linko [273] qui évalue simultanément l'ammoniac et le gaz carbonique libérés par action de la ninhydrine sur les aminoacides.

4° *Techniques colorimétriques*

Nous nous sommes longuement étendu plus haut sur le mécanisme de formation du pourpre de Ruhemann, colorant principal résultant de l'action de la ninhydrine sur les aminoacides; rappelons que d'autres substances colorées, notamment la bis-dicétoindanyle, peuvent prendre également naissance au cours de la réaction; on ne peut écarter l'hypothèse d'une combinaison de l'aldéhyde formé avec la dicétohydrindamine [23, 431]. La complexité de la réaction semble responsable de l'obtention de colorations légèrement différentes avec les différents α-aminoacides [355, 356, 116, 147, 81, 271, 397]; rappelons enfin que d'autres produits d'hydrolyse des protéines, les acides α-iminés, donnent lieu à des réactions chromatiques nettement différentes (voir p. 58).

On peut pratiquer le dosage colorimétrique en milieu liquide, sur des solutions contenant un ou plusieurs aminoacides et même sur des hydrolysats de protéines; on cherche à évaluer ainsi la totalité de l'azote aminé présent [204, 205, 186, 187, 372, 20, 422, 147, 420, 81, 228]; la technique a été appliquée à la pénicilline et à l'acide pantothénique dont on dose ainsi respectivement la pénicillamine [18] ou la β-alanine [527] libérées après hydrolyse. Le dosage en milieu liquide est également utilisé dans les techniques modernes de séparation chromatographique des acides aminés sur des colonnes de résines échangeuses d'ions : on effectue alors des lectures photométriques sur les fractions successivement éluées [507, 302, 303, 120, 417, 210, 232, 304, 305, 418, 476].

La séparation des aminoacides par la chromatographie de partage sur papier, méthode d'une grande simplicité technique et facilement réalisable dans tous les laboratoires, a donné lieu aux publications les plus nombreuses (*). Une simple pulvérisation de ninhydrine, ou encore l'immersion rapide du chromatogramme dans une solution organique de la tricétone, permet, après séchage, une localisation aisée des aminoacides qui apparaissent sous la forme de taches colorées [93, 94, 116, 338, 285, 367, 464, 216, 271, 432, 234, 33]. Une

(*) On consultera à cet effet la revue générale de Boulanger et Biserte [56], et les ouvrages de Lederer [264], Block, Durrum et Zweig [46], Schoen [408], Block et Weiss [47], Brimley et Barrett [61], les comptes rendus du symposium organisé par la Faraday Society (*Disc. Faraday Soc.*, 1949, **7**) ainsi que le numéro spécial du *British Medical Bulletin* (1954, **10**, 161-250).

application originale, basée sur la présence d'aminoacides dans la sueur, permet la révélation des empreintes digitales [331, 332]. Il est d'ailleurs possible d'effectuer sur le spot coloré par l'action de la ninhydrine, de nouvelles réactions de caractérisation plus spécifiques de l'aminoacide [13, 200, 220]. On a proposé d'éviter le temps d'imprégnation du papier par le réactif en incorporant directement la ninhydrine dans la phase solvante [328]. L'hydrate d'indanetrione peut être remplacé par d'autres réactifs généraux des aminoacides, mais il apparaît particulièrement sensible et nettement supérieur à l'alloxanne [96].

On a cherché à rendre quantitatifs les renseignements fournis par la chromatographie sur papier. Le spot coloré peut être comparé visuellement aux spots fournis par des quantités d'aminoacides bien précises [93, 115, 362, 361], mais cette technique nécessite la réalisation de nombreux témoins. Aussi a-t-on pensé que la mesure de la dimension du spot [146, 60, 145] ou l'évaluation photométrique de sa densité optique *in situ* [44, 509, 70, 150, 379, 45, 380, 134, 169, 406] seraient susceptibles de donner des résultats aussi précis. La plupart des auteurs s'orientent, à l'heure actuelle, vers un autre procédé qui consiste à éluer avec un solvant convenable le colorant du papier et à effectuer une lecture photométrique sur le liquide [362, 289, 315, 516, 517, 518, 53, 377, 151, 339, 366, 272, 504, 337, 31, 162, 245, 233] ; une variante consiste à localiser dans un premier temps l'aminoacide par une légère pulvérisation de ninhydrine et à terminer le développement de la coloration en milieu liquide [24, 259, 52, 431, 343, 359] ; l'interférence de l'ammoniaque peut être éliminée par l'emploi d'une résine échangeuse d'ions [243].

Que l'on opère en milieu liquide ou sur papier, le dosage idéal doit répondre aux nombreuses exigences suivantes :

— Etre sensible, grâce à la formation d'une coloration maximum pour la quantité d'aminoacide présente;

— Donner des résultats comparables pour les divers aminoacides, en favorisant le développement d'une même coloration pour la même quantité d'azote aminé;

— Donner des résultats reproductibles, grâce à la stabilisation de la coloration obtenue;

— Permettre, par une simplicité technique suffisante, le travail en série, si possible sur le milieu même où s'est effectuée la réaction, évitant ainsi de longues et pénibles

extractions du colorant [113, 114, 80, 77, 78, 79, 358, 360, 488, 489, 431].

Pour répondre à ces différents problèmes ainsi qu'aux conditions particulières de certains dosages, une multitude de perfectionnements ont été proposés, dont nous ne mentionnerons ici que les caractères généraux.

Le papier utilisé pour la chromatographie doit être soigneusement débarrassé des sels d'ammonium qu'il contient souvent, par des lavages [53, 152, 330, 151], ou en tout cas soigneusement sélectionné [342]. L'intervention possible au cours de la réaction ninhydrine-aminoacides de l'hydrindantine ou du dicétoindanol, produits de réduction de la tricétone, aussi bien que la sensibilité à l'oxydation du pourpre de Ruhemann, ont amené certains auteurs à effectuer la réaction chromatique en présence de divers agents réducteurs, acide ascorbique [461, 526], cyanure de potassium [469, 530, 91, 337, 383], chlorure stanneux [302, 151, 431, 429, 219] ou en présence d'hydrindantine elle-même [53, 151, 469, 305].

L'emploi de solvants organiques comme milieu réactionnel a été souvent préconisé : l'acide acétique [92] agit vraisemblablement en maintenant le milieu au *p*H optimum pour l'apparition de la coloration; le méthylcellosolve, employé par de nombreux chercheurs [302, 151, 343, 305, 530], maintient l'hydrindantine en solution et joue probablement un rôle favorisant comme l'éthanol [400, 337], la pyridine [186, 187, 24, 348, 517, 526] ou des mélanges encore plus complexes [147, 303, 469, 383].

Pour le séchage des chromatogrammes, la température [68] et l'humidité du milieu [504, 505] doivent être contrôlées; ici encore, la présence de solvants organiques [463, 381] joue un rôle favorable.

La présence de sels minéraux modifie souvent les colorations fournies par les acides α-aminés [254, 293]; cette remarque à permis à Crumper et Dent [103] de mettre au point la différenciation sur les chromatogrammes des acides α-, β-, γ-, δ- et ε-aminés, tandis que Hein et Griefahn-Osswald [202] mesurent ainsi la stabilité des complexes métalliques des aminoacides. La formation de complexes métalliques du pourpre de Ruhemann est habituellement utilisée pour stabiliser le colorant formé [231] : les sels de cuivre [50, 49, 48, 534], de cadmium [307, 31, 274, 119] ou de cobalt [508] sont les plus employés.

B. — Applications de la ninhydrine a l'analyse d'autres substances

Si la ninhydrine a pu être proposée comme réactif « empirique » pour le diagnostic de certaines maladies végétales [425], si le pourpre de Ruhemann a été proposé comme indicateur coloré [54], il ne s'agit là que d'applications mineures. En dehors de ses nombreux emplois pour l'analyse des aminoacides, diverses utilisations ont été proposées qui sont la conséquence de sa large réactivité chimique sur laquelle nous nous sommes précédemment longuement étendu. Sans prétendre être complets, signalons simplement l'utilisation de la ninhydrine à l'analyse, qualitative ou quantitative, des aminoalcools [158], des osamines [21, 160, 468, 235, 340, 443], des amines primaires libres [45, 57, 108, 221, 28, 345] ou libérées par hydrolyse [203, 496, 88], des phosphatides [270, 201, 261, 64], de l'ammoniaque [333, 143]. Notons encore les réactions analytiques fournies avec les acides thiazolidine carboxyliques [336], l'hydrazinophtalazine [386] et les polyamides [69].

Certaines substances non azotées peuvent interférer dans les applications analytiques de la tricétone [19, 20], surtout en présence d'ammoniac [241]. D'autres peuvent être évaluées quantitativement par la ninhydrine : c'est le cas du propionaldéhyde [223], de la testostérone [256] et de la désoxycorticostérone [288].

IV. — APPLICATIONS DIVERSES

Nous résumerons sous cette rubrique l'utilisation de la ninhydrine dans la réaction d'Abderhalden et son emploi dans les techniques histologiques.

A. — La réaction d'Abderhalden

Au lendemain des publications de Ruhemann, la ninhydrine a trouvé une première application dans la « réaction d'Abderhalden » qui a fait connaître l'hydrate de tricétohydrindène au public biologique et médical. Abderhalden admettait que l'introduction dans l'organisme d'éléments étrangers (cellulaires ou moléculaires) suscitait l'élaboration de ferments lytiques spécifiques; ces enzymes apparaîtraient aussi bien au

cours d'états physiologiques, comme la grossesse (à la suite du passage dans les humeurs maternelles de cellules choriales par exemple), qu'au cours de maladies (cancer, tuberculose, affections hépatiques, ramollissement cérébral...).

La mise en évidence de ces enzymes s'effectue en mettant en présence, dans un dialyseur, le sérum et le tissu normal (placenta) ou pathologique (tissu néoplasique, fragment de cerveau...). On cherche dans le dialysat la présence de produits d'hydrolyse protéolytique. Abderhalden utilisait initialement la réaction du biuret, mais la ninhydrine lui a semblé plus sensible.

Malgré le grand nombre de publications consacrées à cette technique [1, 156, 2, 3, 8, 9, 111, 112, 148, 227, 258, 294, 295, 334, 352, 501] et les améliorations apportées plus récemment [4, 5, 6], la réaction d'Abderhalden est presque complètement abandonnée à l'heure actuelle : on ne la trouve même pas citée dans l'index alphabétique du nouveau traité de médecine de Lemierre et coll. [266]. Peut-être les nouvelles thérapeutiques tissulaires lui donneront-elles un regain d'actualité.

On peut rapprocher de la réaction d'Abderhalden la protéolyse observée lorsqu'on met en présence de sérum une hormone (adrénaline, thyroxine, etc.) et une protéine extraite de la glande endocrine correspondante [286].

B. — Utilisation histologique

La réaction chromatique que fournit la ninhydrine avec les protéines devait évidemment conduire les anatomistes à utiliser la tricétone comme réactif histochimique. Les premiers essais ont été effectués par Laserstein [260] qui démontre effectivement la coloration de certains tissus : le muscle et les hématies en particulier donnent une coloration importante. Loew confirme ces résultats dans le domaine de la cytologie végétale [277], tandis que Berg a consacré plusieurs études à l'application de cette technique à la cellule hépatique [37, 38, 40] et au sang [38, 39]. La coloration particulière des leucocytes et des éosinophiles a été bien étudiée par Klewitz et Krieger [240]. Rappelons encore les travaux de Giroud sur la cellule [164].

Malgré les perfectionnements récemment apportés par Hutton [215], l'utilisation de la ninhydrine comme réactif histochimique des protéines et de leurs produits de dégradation n'est pas exempte de critiques. Dès 1922, Berg [38]

craint que le colorant bleu hydrosoluble puisse diffuser hors du site où s'est produite la réaction chromatique initiale et soit secondairement adsorbé sur d'autres structures cellulaires. Vercauteren a d'ailleurs montré récemment [487] que le sel d'ammonium de la DYDA (voir p. 40), colorant acide, possède le même pouvoir tinctorial que la ninhydrine elle-même; il est d'ailleurs possible de déplacer le colorant bleu par l'éosine, colorant également acide possédant une affinité tissulaire plus forte.

Ces critiques peuvent être partiellement levées si l'on met en évidence, par le réactif de Schiff, les groupements aldéhydiques libérés par l'action de la ninhydrine sur les groupements aminés, comme viennent de le préconiser Yasuma et Ichikawa [529]; remarquons que la teinte ainsi obtenue est plus faible si les protéines sont préalablement soumises à l'action de l'urée ou de la chaleur [157].

CHAPITRE IV

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE LA NINHYDRINE

« Ce n'est pas un paragraphe, mais un livre entier qu'il faudrait consacrer aux propriétés physiologiques des cétones, car, depuis la plus haute antiquité, le corps humain se voit administrer de tels composés sous forme de parfums, de médicaments, et même d'aliments. » Cette phrase de Lombard [278], appliquée aux monocétones, nous permet de supposer *a priori* que notre tricétone, à réactivité si large, possède des propriétés biologiques fortement accusées. L'expérience a montré qu'il en était bien ainsi, et l'hydrate d'indanetrione a donné lieu à d'intéressantes applications dans des domaines très variés.

I. — TOXICITÉ DE LA NINHYDRINE

Ici encore, Ruhemann s'est montré un précurseur, puisqu'il signale, dès 1911 [389], quelques essais physiologiques réalisés, sur sa demande, dans un laboratoire allemand; ce sont probablement ces expériences dont le détail a été donné ultérieurement par Loew [276] et Laserstein [260].

Etudes sur les microorganismes

C'est Loew [276] qui a montré le premier l'action de la ninhydrine sur diverses bactéries, dont la pousse, sur un milieu synthétique dépourvu d'élément organique azoté, s'avère complètement inhibée pour une concentration de 1 μg/ml. Dulong de Rosnay et Martin-Dupont [127] constatent que la croissance du staphylocoque doré n'est inhibée

que pour une teneur de 316 µg/ml, mais ces auteurs effectuent leurs essais en eau peptonée, milieu contenant de nombreuses substances capables de réagir avec la ninhydrine. Au cours de ces essais, un fait nouveau a été mis en évidence : l'incubation du milieu contenant la ninhydrine avec de la cystéine, à la neutralité, fait apparaître une activité antibiotique trois fois supérieure à celle de la tricétone. Pour expliquer ce phénomène, Tayeau et coll. [456] émettent l'hypothèse de la formation d'un dérivé de la thiazolidine, cycle présent dans la pénicilline; il serait intéressant de connaître le pouvoir antibiotique du produit de condensation de la ninhydrine avec la cystéine décrit par Kuhn (voir p. 51). L'action bactériostatique de la ninhydrine doit être rapprochée de celle d'une autre cétone indanique, le dicéto-1,3-caproyl-2-indane [198], substance qui possède par ailleurs des propriétés insecticides [238, 129, 236, 207].

Les champignons inférieurs apparaissent moins sensibles à l'action de la tricétone [276], probablement en raison de la difficulté de pénétration endocellulaire; signalons cependant que Thom [462] a noté l'induction de changements génétiques chez *Aspergillus niger* sous l'effet de la ninhydrine; on peut rapprocher de ce fait les propriétés mutagènes des dérivés thioloprives [86].

La ninhydrine se montre également très toxique pour les algues, les graines de phanérogames et les protozoaires [276].

Etudes sur les animaux supérieurs

La ninhydrine, injectée par la voie parentérale, s'est montrée toxique chez tous les animaux expérimentés; les premiers essais de Loew [276] chez la Souris ont été confirmés chez le Cobaye [276, 444], la Grenouille [260], le Lapin [485, 300] et surtout chez le Rat blanc [208, 444] : chez ce dernier animal, des doses de 60 mg/kg sont tolérées pendant deux jours [66], mais l'utilisation de doses de 80 mg/kg [176] ou de 100 mg/kg [7] entraîne la mort des sujets injectés. Nous nous étendrons dans notre partie expérimentale sur les symptômes observés; signalons simplement ici que la ninhydrine, non hémolytique *in vitro*, se révèle assez fortement hémolytique *in vivo* chez le Rat, surtout lorsque cet animal est soumis à une carence en tocophérol [176, 382]. Le mécanisme de l'action toxique de la ninhydrine est loin d'être encore élucidé; l'existence de trois groupements cétoniques

vicinaux dans la molécule semble fondamentale puisque la ninhydrylurée se montre pratiquement dépourvue de nocivité [7]. L'hydrate de tricétohydrindène apparaît mieux supporté lorsqu'on l'administre par voie digestive [276], mais la dose de 750 mg chez le Lapin entraîne cependant la mort [51]; la diminution de la toxicité par voie entérale provient vraisemblablement de la présence dans le tube digestif de nombreux produits susceptibles de réagir avec la ninhydrine pour donner des dérivés substitués sur le sommet 2 et par conséquent moins toxiques.

Nos connaissances sur le métabolisme de la ninhydrine et des composés indéniques ou indaniques, d'une manière plus générale, sont encore embryonnaires; Böhm [51] a étudié l'élimination de l'indène, de l'indane, de l'indanone-1 et de la ninhydrine comparativement à celle de l'indole : les composés homocycliques entraînent dans l'urine une augmentation des esters sulfuriques et des conjugués glycuroniques, mais la nature précise des transformations subies *in vivo* par la ninhydrine reste mystérieuse : plusieurs auteurs ont remarqué une coloration bleu violacé au voisinage du point d'injection, mais il ne semble pas que l'on retrouve dans l'urine du pourpre de Ruhemann ou de la ninhydrine libre [51]; il convient de noter que l'injection d'alloxanne est suivie au contraire de l'excrétion urinaire de murexide [74]. Signalons enfin le travail récent de Brooks et Young [63] qui nous apprennent la transformation de l'indène *in vivo* en *cis*- et en *trans*-indanediol.

La découverte des propriétés diabétogènes de l'alloxanne (*) a conduit de nombreux chercheurs à examiner le comportement de substances chimiquement voisines, et particulièrement de la ninhydrine. Bien que Stoll [444] ait noté l'apparition de glycosurie chez le Rat traité par la ninhydrine, ces observations n'ont pas été confirmées par d'autres travailleurs. Hidy [208] a bien constaté, après l'injection, une légère hyperglycémie transitoire chez quelques rats, mais n'a pu déceler aucune altération permanente de la glycémie. Abderhalden [7], Brückmann et Wertheimer [66], comme de Moor [300], ne pensent pas que la ninhydrine soit réellement diabétogène. Cette substance est cependant capable, comme l'alloxanne, d'entraîner des lésions pancréatiques [444, 485]

(*) Au sujet du diabète alloxannique, consulter la revue générale de Lukens [280] et la monographie récente de de Moor [300].

localisées au niveau des îlots de Langherhans; comme l'alloxanne également, la ninhydrine fait baisser le taux du glutathion sanguin et se montre même plus active encore que le composé hexahydropyridinique [66]. Il semble en effet que l'action thioloprive de l'alloxanne ne soit pas le seul facteur responsable de l'apparition du diabète; il faut prendre en considération l'action chélatante de l'alloxanne sur le zinc [71], puisque d'autres agents complexants, notamment la dithizone et l'oxine [226, 300], se sont également montrés diabétogènes.

II. — NINHYDRINE ET ENZYMES

Les premières recherches sur la réaction de la ninhydrine avec les enzymes ont été publiées en 1948 par Zittle [533] qui a observé l'action inhibitrice sur la ribonucléase, à la concentration de 0,01 M. L'année suivante, Griffiths [171] démontre que l'hexokinase du muscle de Rat est inhibée à 80 p. 100 par la tricétone à la concentration de 5×10^{-3} M; dans les mêmes conditions, l'alloxanne entraîne une inhibition totale; une différence plus importante encore entre le composé cyclanique et le composé hétérocyclique, se révèle en étudiant l'influence de la cystéine sur l'inhibition : l'acide aminé soufré, à la concentration de 5×10^{-3} M, s'oppose complètement à l'action de l'alloxanne, tandis que, même à une concentration double, la cystéine ne lève que partiellement l'inhibition enzymatique provoquée par la ninhydrine. Ces constatations ne peuvent s'expliquer par la seule action de la ninhydrine sur les groupements thiols.

L'action thioloprive de la ninhydrine, montrée par Gilmour et Calaby [163], peut être facilement mise en évidence sur la myosine, grâce à la réaction au nitroprussiate de sodium; elle s'avère plus importante à *p*H = 9 qu'à *p*H = 7, mais les auteurs australiens ne sont pas arrivés à doser convenablement les groupements — SH en présence de ninhydrine. La myosine, traitée par la tricétone, perd 90 p. 100 de ses propriétés ATP-asiques, l'inhibition étant totalement levée par la cystéine lorsque l'action de la ninhydrine n'a pas été trop prolongée; les autres acides aminés s'avèrent inactifs. La myosine, dont les propriétés enzymatiques sont bloquées, réagit encore avec l'actine, comme le montrent des mesures viscosimétriques. L'addition d'ATP à l'actomyosine traitée par la ninhydrine, cause toutefois la précipitation du complexe

protéique plutôt que sa dissociation en myosine et en actine.

Tayeau, Marquevielle et Marquevielle-Régnier [370, 457] ont entrepris l'étude systématique de l'action de la ninhydrine sur divers enzymes protéolytiques. La papaïne, enzyme dont le fonctionnement nécessite la présence de groupements sulfhydrile libres, se montre fortement inhibée par la tricétone; la pepsine, au contraire, dont on connaît l'indépendance vis-à-vis des — SH, apparaît plus active après ninhydrisation, tandis que la cinétique de l'hydrolyse par la trypsine ne subit aucune modification; signalons, en outre, que le traitement par la ninhydrine du substrat utilisé par ces auteurs (protéines sériques) le rend plus sensible à l'action de la papaïne et de la trypsine, mais non de la pepsine.

Plus récemment, enfin, Bruns [67] a consacré un travail à l'action inhibitrice de la ninhydrine sur la xanthine-déshydrase : la tricétone indanique s'avère ici plus active que l'alloxanne, mais moins active que l'isatine, dicétone indolique donnant également la réaction de Strecker.

III. — NINHYDRINE ET RÉACTIONS IMMUNOLOGIQUES

L'utilisation de la ninhydrine par les immunochimistes a donné lieu à plusieurs constatations intéressantes.

La fixation de la tricétone sur les protéines est susceptible de modifier leur caractère antigénique : c'est ce qu'observe Dulière, aussi bien avec les protéines sériques [124] qu'avec la gélatine [126] ; ces dernières expériences apparaissent particulièrement probantes, car la gélatine est dépourvue de propriétés antigéniques [211, 212, 89] qui n'apparaissent qu'après diazotation [14]. Le traitement par la ninhydrine amène la disparition des propriétés nocives de la toxine tétanique [59].

C'est surtout l'action curieuse de l'hydrate de tricétohydrindène sur les anticorps qui a retenu l'attention des chercheurs. Eggerth [132] a montré en effet, en 1942, que les agglutinines antityphoïdiques H du sérum de Lapin immunisé possèdent un titre supérieur après action de la ninhydrine; d'autres anticorps fournis par le même animal (agglutinines antityphoïdiques O et anticorps antipneumococciques) ne subissent pas, dans les mêmes conditions, cette augmentation, pas plus que les agglutinines antityphoïdiques H du Cheval; les agglutinines antityphoïdiques O et les anticorps antipneumococciques d'origine équine sont même détruits par la ninhydrine;

des constatations analogues ont été effectuées pour d'autres systèmes agglutinants par Capdejelle [72].

De nombreuses publications ont été consacrées par Tayeau et son équipe du laboratoire de chimie biologique de la Faculté de médecine de Bordeaux aux interférences immunologiques de la ninhydrine. Les constatations d'Eggerth ont été étendues à de nombreux systèmes précipitants dont les anticorps sont fournis par le Lapin [452, 454, 136, 449] : après action de la ninhydrine, l'immunsérum de ce rongeur a conservé son titre en anticorps et sa spécificité. Les immunsérums hémolytiques de Lapin manifestent un comportement similaire [459] ; de plus, la ninhydrine restaure leur pouvoir précipitant initial aux immunsérums délipidés [453, 455, 136] : on sait en effet, depuis Hardy et Gardiner [190], que les immunsérums délipidés ne donnent aucun floculat lorsqu'on les met en présence de l'antigène, alors que leur pouvoir antitoxique n'a subi aucune modification à la suite du départ des lipides. L'effet favorable de la ninhydrine ne se manifeste qu'avec les anticorps de Lapin [136, 450] ; Tayeau et Faure [451, 136] ne peuvent expliquer ce phénomène par des modifications de la solubilité des anticorps et admettent que la tricétone augmente « l'avidité » des seuls immunsérums de Lapin.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES SUR LA NINHYDRINE

Le nombre des références bibliographiques que nous avons été amené à citer dans la première partie de notre ouvrage montre suffisamment l'intérêt qu'a suscité la ninhydrine auprès de chercheurs appartenant à des domaines très différents : organiciens, physicochimistes, analystes, biochimistes, immunologistes ont trouvé, dans leurs disciplines respectives, place pour diverses applications de l'hydrate de tricétohydrindène.

Ces publications n'ont cependant pas épuisé le sujet, et de très nombreuses inconnues demeurent encore, même parfois relatives aux propriétés fondamentales de la tricétone. Nous avons essayé d'apporter quelques données nouvelles et de préciser certaines réactions déjà connues.

Nous exposerons dans le chapitre premier les recherches que nous avons effectuées pour préciser quelques caractéristiques physiques de la ninhydrine (caractéristiques chromatographiques, électrotitration, spectre d'absorption infrarouge et spectre de diffraction de rayons X). Le second chapitre est consacré à la description des réactions chimiques que donne la ninhydrine avec les dérivés azotés de l'acide carbonique, diverses amines aromatiques et hydrazines, et divers composés soufrés. Nous apportons ensuite le détail des expériences que nous avons réalisées sur la réaction ninhydrine - aminoacides : réaction en présence de différents alcools, essais chromatographiques et microcristalloscopiques.

La description de dérivés de la ninhydrine apparentés à la riboflavine et possédant une action antivitaminique B_2 (chapitre IV) nous amène aux deux derniers chapitres, plus spécialement biologiques : après avoir étudié l'action de la ninhydrine sur l'hématie humaine et le comportement particulier du globule ainsi traité, nous apportons enfin des précisions sur la toxicité de la tricétone, tandis que nous en décrivons quelques propriétés pharmacodynamiques.

CHAPITRE PREMIER

QUELQUES NOUVELLES CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DE LA NINHYDRINE

Nos essais sur les caractéristiques chromatographiques et sur l'électrotitration de la ninhydrine ont pu être entièrement réalisés dans notre laboratoire. Grâce à l'amabilité du Centre de physico-chimie structurale et du Laboratoire de minéralogie de la Faculté des sciences de Bordeaux, il nous est possible de décrire ici le spectre d'absorption infrarouge de la ninhydrine et de donner quelques précisions sur les cristaux de ce produit.

I. — ÉTUDE CHROMATOGRAPHIQUE DE LA NINHYDRINE

Nous n'avons trouvé dans la littérature mention que d'un seul article dans lequel la ninhydrine est séparée d'autres produits grâce à la chromatographie de partage sur papier : Stoffyn et Jeanloz [443], étudiant la dégradation des osamines par la ninhydrine, ont chromatographié le mélange réactionnel en prenant comme phase solvante le système éthanol, *n*-butanol, eau (1:4:1) ; la ninhydrine, que ces auteurs révèlent grâce à ses propriétés réductrices par la technique de Trevelyan et coll. [468], présente un Rf de 0,85.

Nos essais chromatographiques ont été réalisés sur différents papiers, grâce à la technique ascendante, à la température de 24±1° C. La ninhydrine a été déposée à la dose de 10 μg en solution dans 10 μl d'eau distillée. La montée de la phase solvante a été arrêtée lorsque le front se trouve à

environ 30 cm de la ligne de dépôt des spots. Le chromatogramme est séché à la température ambiante dans un courant d'air. La ninhydrine est révélée par différents procédés :

1° Par pulvérisation d'une solution saturée de dinitro-2,4-phénylhydrazine dans l'alcool chlorhydrique et chauffage à l'étuve jusqu'à ce que le papier soit sec. La tricétone apparaît sous la forme d'un spot jaune plus foncé que le fond général du papier, lui-même coloré en jaune; l'exposition aux vapeurs ammoniacales, à froid, fait virer le spot à l'orangé; ce virage est très fugace : dès que l'ammoniac s'est évaporé, la coloration jaune reparaît. Cette coloration jaune se montre stable au cours du vieillissement des chromatogrammes.

TABLEAU I

Valeur du Rf de la ninhydrine dans différents systèmes chromatographiques.

Phase solvante	Papier	Rf
NaCl 30 p. 1.000	Arches 304	0,79
NaCl 30 p. 1.000	SS 2043 b (*)	0,76
NaCl 30 p. 1.000	SS 2045 b	0,66
KCl 30 p. 1.000	Arches 304	0,85
PO_4HNa_2-PO_4H_2Na M/15, *p*H = 6,5	Arches 304	0,83
Ethanol à 95 p. 100	Arches 304	0,90
n-Butanol saturé d'eau	SS 2043 b	0,90
Ethanol, *n*-butanol, eau (1 : 2 : 2)	Arches 304	0,92
Ethanol, *n*-butanol, eau (1 : 2 : 2)	SS 2043 b	0,90
Ethanol, *n*-butanol, eau (1 : 2 : 2)	SS 2045 b	0,88
Ethanol, alc. benzylique, eau (5 : 100 : 5)	Arches 304	0,97
n-Butanol, alc. benzylique, eau (15 : 80 : 5)	Arches 304	0,92
n-Butanol, ac. acétique, eau (78 : 5 : 17)	Whatman n° 1	0,87
n-Butanol, ac. acétique, eau (78 : 5 : 17)	SS 2043 b	0,91
n-Propanol, ac. acétique N (3 : 1)	SS 2043 b	0,90
Acétate d'éthyle, pyridine, eau (8 : 2 : 1)	SS 2043 b	0,92 (**)
Méthanol, *n*-pentanol, benzène, eau (2 : 1 : 1 : 1)	SS 2043 b	0,88
n-Butanol, ac. acétique, pyridine, eau (4 : 1 : 1 : 2)	SS 2043 b	0,93

(*) SS = Schleicher et Schüll.
(**) Spot aplati.

2° Par pulvérisation d'une solution à 0,5 p. 100 de *p*-sulfophénylhydrazine dans l'alcool à 25° et chauffage à l'étuve à 100° C. Le spot obtenu, de couleur rouge, se détache nettement sur le fond faiblement coloré en jaune-brun. Nous reviendrons plus longuement (chapitre II) sur l'action de la *p*-sulfophénylhydrazine sur la ninhydrine en étudiant la réactivité de la tricétone avec les dérivés de l'hydrazine.

3° En traitant le chromatogramme par la méthode classique de détection des composés pyridiques par le bromure de cyanogène et l'ammoniac (exposition de quinze minutes aux vapeurs de bromure de cyanogène, puis de quinze minutes aux vapeurs d'ammoniaque), nous avons remarqué que le spot correspondant à la ninhydrine, qui ne donne lieu à aucune coloration visible, présente en lumière ultraviolette une belle fluorescence verte; le bromure de cyanogène seul ne donne qu'une fluorescence bleue.

On trouvera dans le tableau I les différents Rf que nous avons pu noter dans treize systèmes de phases solvantes. Le système bien connu phénol saturé d'eau ne nous a pas permis de retrouver le spot de la ninhydrine, ce qui laisse supposer une réaction entre la tricétone et l'acide phénique.

II. — ÉTUDE POTENTIOMÉTRIQUE DE LA NINHYDRINE

En étudiant plus haut les propriétés chimiques de la ninhydrine, nous avons indiqué la stabilité de la tricétone vis-à-vis des acides, tandis que cette substance est rapidement dégradée sous l'influence des bases.

Les titrations potentiométriques que nous avons effectuées ont pleinement confirmé ces données. Nous avons adopté le protocole suivant :

— Ninhydrine : 1 mM dissoute dans 50 ml d'eau distillée;
— Titration avec NaOH 0,2 N ou HCl 0,2 N;
— *p*H mètre Radiometer PHM 3.

La solution de ninhydrine présente une légère acidité, puisque son *p*H est déjà de 4,2. L'addition d'acide chlorhydrique, comme le montre la courbe A, fait baisser progressivement le *p*H; si l'on neutralise alors cette solution chlorhydrique par de la soude, la courbe de neutralisation B se confond absolument avec la courbe A : ceci démontre que la tricétone ne s'est pas modifiée au cours de son passage à un *p*H voisin de 2.

Il n'en est pas de même lorsqu'on effectue au contraire l'alcalinisation de la solution aqueuse de ninhydrine; la courbe

C est très différente de la courbe D obtenue en neutralisant par l'acide chlorhydrique une solution alcaline de ninhydrine. Le passage en milieu de *p*H élevé a donc donné naissance à un acide qui est vraisemblablement l'acide phénylglyoxal-*o*-carboxylique, puisque la courbe D ne présente qu'un seul accident notable. La destruction de la ninhydrine n'est cependant pas complète, car le liquide d'expérience, après la double titration (C + D), donne encore une forte coloration bleue avec le glycocolle.

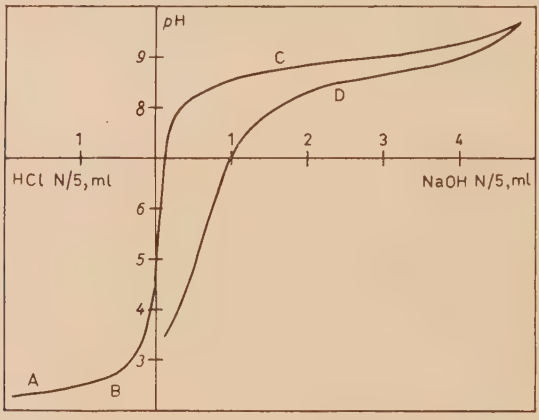


Fig. 1.

Electrotitration d'une solution aqueuse de ninhydrine (voir texte).

On note sur la courbe C l'existence d'une inflexion, correspondant à un *p*K de 8,8, dans l'équilibre :

L'inflexion de la courbe D montre un *p*K inférieur, en raison de la présence d'un acide plus fort, l'acide phénylglyoxal-*o*-carboxylique.

III. — SPECTRE D'ABSORPTION INFRAROUGE DE LA NINHYDRINE

Alors que le spectre d'absorption ultraviolette de la ninhydrine est bien connu [369, 283, 357], son équivalent en lumière infrarouge n'a fait l'objet que d'une brève mention de Stepan et Kral [441] qui publient en 1953 le cliché du diagramme obtenu sans l'accompagner de commentaires. Ce travail nous avait d'ailleurs échappé lorsque nous avons demandé à M^lle^ Josien, professeur à la Faculté des sciences de Bordeaux, de bien vouloir effectuer dans son service l'analyse spectrale infrarouge d'un échantillon de ninhydrine que nous avions recristallisée à deux reprises selon la technique de Hamilton et Ortiz [182]. Le diagramme de la figure 2 et les commentaires ci-dessous sont inspirés par M^lle^ Josien que nous remercions à nouveau.

Les appareils utilisés sont les modèles Perkin-Elmer 126, simple passage, simple faisceau et 112, double passage, simple faisceau. Les prismes employés sont en chlorure de sodium (région de 667 à 2.000 cm^{-1}, courbe 1, appareil 126), en fluorure de calcium (région de 1.400 à 3.500 cm^{-1}, courbes 2 et 3, appareil 126) ou en fluorure de lithium (région de 2.700 à 3.500 cm^{-1}, courbe 4, appareil 112).

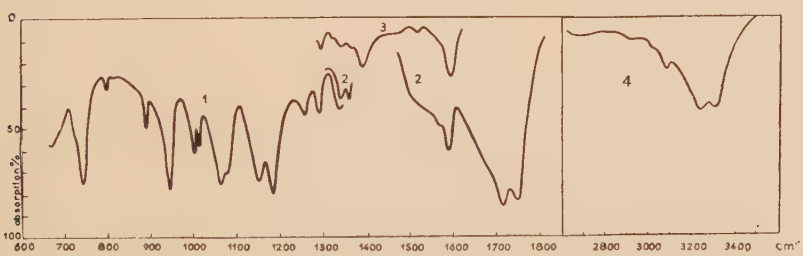


Fig. 2.

Spectre d'absorption infrarouge de la ninhydrine (voir texte).

En raison de la quasi insolubilité de la ninhydrine dans les solvants usuels en spectroscopie infrarouge, les spectres ont été déterminés sur la ninhydrine à l'état solide, en dispersion dans l'huile de paraffine (nujol, courbes 1 et 2) ou dans le bromure de potassium (courbes 3 et 4). Les bandes propres du nujol interférant avec les bandes du corps dans les régions

de 1.300-1.400 et 3.000 cm^{-1}, les spectres ont été enregistrés à partir d'un disque de KBr. Pour les autres régions, les spectres enregistrés à partir du disque de KBr confirment les spectres enregistrés à partir de la pâte dans le nujol. L'ouverture de fente est réglée automatiquement.

Le détail du spectre est donné dans le tableau ci-dessous, dans lequel les fréquences de bandes d'absorption d'infrarouge sont exprimées en unités ν, mesurées en centimètres réciproques cm^{-1}, unité définie par la relation $\nu = \frac{1}{\lambda \text{ cm}}$.

TABLEAU II

Spectre d'absorption infrarouge de la ninhydrine.

Tableau des bandes.
(Fréquence en cm^{-1}.)

723 ép.	1.150 FF	1.584 ép.
741 F	1.183 F	1.590 M
796 f	1.258 M	1.718 TF
889 M	1.290 M	1.748 TF
944 F	1.341 f	2.925 tf
1.002 M	1.361 f	3.040 tf
1.014 M	1.387 M	3.085 f
1.064 F		3.240 M
1.078 ép.		3.310 M

(TF = très forte; F = forte; M = moyenne; f = faible; tf = très faible; ép. = épaulement.)

Ce spectre, dans l'ensemble, n'est pas incompatible avec la structure d'un hydrate de tricétone aromatique :

On retrouve les principales bandes d'un noyau benzénique ortho-disubstitué (une bande F à 741 cm^{-1}, une série de bandes entre 1.000 et 1.200 cm^{-1}, une absorption à 3.085 cm^{-1}) ;

— Deux bandes CO fortes et bien résolues à 1.718 et 1.748 cm^{-1}; sur le côté de la bande, à 1.718, existe une absorption large qui pourrait correspondre au troisième CO dont la vibration serait gênée par l'hydratation;

— La présence de l'eau est probablement responsable des deux absorptions larges dont les maximum sont situés à 3.240 et 3.310 cm^{-1}.

La position des C=O peut paraître relativement élevée

puisqu'il s'agit de C=O conjugués avec le noyau benzénique, mais ces C=O font partie d'un cycle à cinq atomes qui est connu pour son effet positif sur les fréquences :

Fluorénone [224]	C=O	=	1.720 cm^{-1}
Indone	C=O	=	1.730 cm^{-1} (fréquence calculée)
Cyclopentadiénone	C=O	=	1.730 cm^{-1} (fréquence calculée).

IV. — QUELQUES CARACTÉRISTIQUES CRISTALLOGRAPHIQUES DE LA NINHYDRINE

La ninhydrine, substance de solubilité modérée, cristallise facilement à partir de différents solvants : eau, alcool, etc.

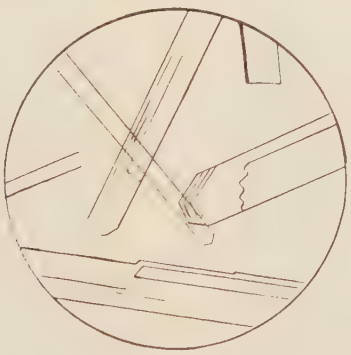


FIG. 3.

Aspect microscopique des cristaux de ninhydrine, recristallisés dans HCl 2 N.

La figure 3 montre l'aspect microscopique des cristaux obtenus au cours de la purification dans HCl 2 N, selon la technique de HAMILTON et ORTIZ [182].

Ce sont des cristaux analogues que nous avons confiés à M. CLASTRE, assistant de Minéralogie à la Faculté des sciences de Bordeaux, qui a bien voulu effectuer pour nous quelques diagrammes de diffraction de rayons X, dans le service de M. le professeur GAY.

Les clichés de la page 87 ont été obtenus avec la raie K = 1,54 Å du cuivre. Sur la figure 4, nous avons représenté le diagramme de Bragg, obtenu par rotation de 360° autour

de la direction d'allongement des cristaux (40 kV, 9 mA, 2 h). On peut en déduire la période suivant la direction d'allongement.

Trois clichés, réalisés avec l'appareil de DE JONG, sont reproduits sur la figure 5.

Les clichés A et B correspondent aux plans zéro et 1, perpendiculaires à la direction d'allongement. Ils montrent que le système est monoclinique ($\beta = 110°$) et permettent de mesurer les deux autres périodes. Le cliché C a été obtenu par rotation du cristal suivant un axe perpendiculaire à la direction d'allongement : il permet de fixer le groupe spatial.

L'interprétation de ces diagrammes conduit aux résultats suivants :

La ninhydrine cristallise dans le système monoclinique en possédant une hémièdrie énantiomorphe. Les caractéristiques de la maille sont les suivantes :

$$a = 11{,}96\ \text{Å} \qquad b = 6{,}04\ \text{Å} \qquad c = 5{,}81\ \text{Å} \qquad \beta = 110°$$

L'allongement du cristal qui correspond à l'axe binaire, s'effectue selon y. Le groupe spatial est :

$$P\,2_1 — C_2^2$$

Il y a deux molécules dans la maille, et la densité théorique est de 1,50.

Le seul composé voisin pour lequel nous ayons trouvé des renseignements cristalloscopiques dans la littérature est l'indanedione-1,3, qui cristallise, comme l'a montré PICHETTO [350], dans le système quadratique (a : c = 1:0,9414; d = 1,37).

La présence d'un axe binaire et d'une hémiédrie énantiomorphe dans les cristaux de ninhydrine n'est pas incompatible avec l'absence de carbone asymétrique dans la structure de la tricétone. C'est l'association des deux molécules constituant la maille qui entraîne l'apparition de cette asymétrie, peut-être en raison de la non planéité du cycle pentagonal.

Nous avons mesuré expérimentalement la densité des cristaux de ninhydrine pour comparer la valeur trouvée à la valeur théorique.

Pour effectuer cette détermination, nous avons utilisé la quasi insolubilité de la ninhydrine dans le tétrachlorure de carbone. La détermination au pycnomètre du volume de

FIG. 4 (ci-contre)

Diagramme de Bragg de la ninhydrine (rotation autour de la direction d'allongement).

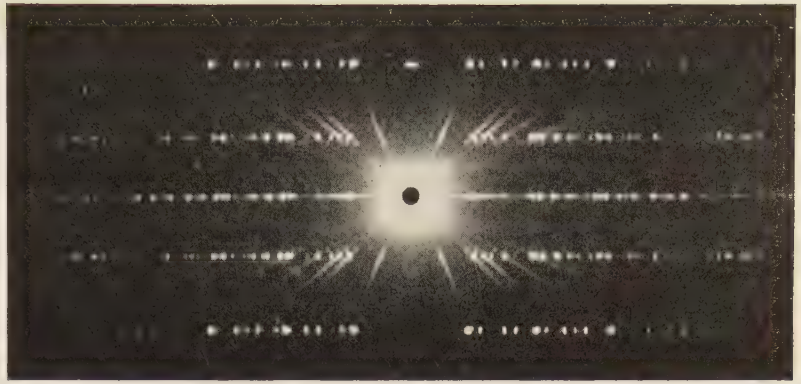
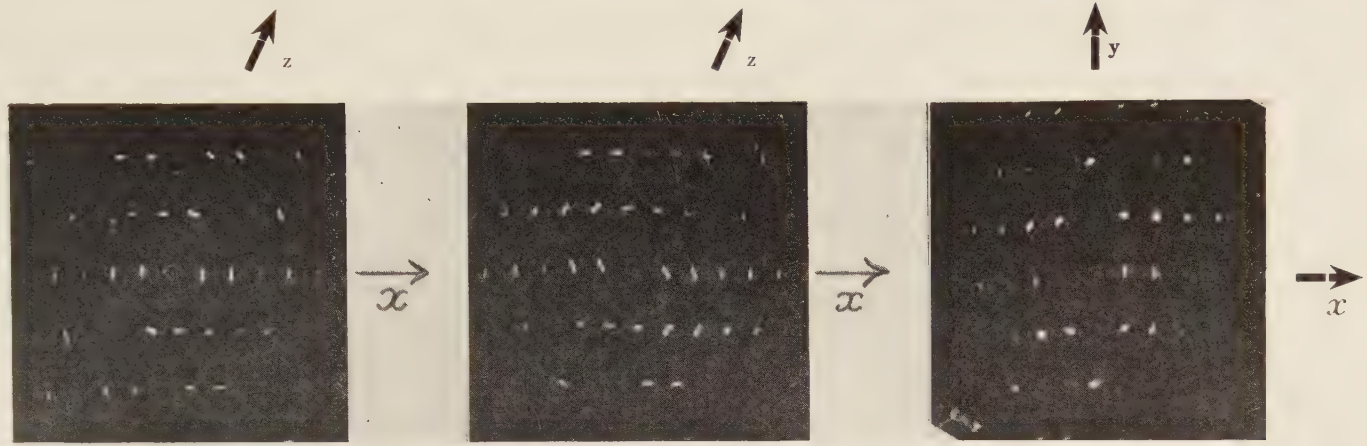


FIG. 5 (ci-dessous)

Diagramme de De Jong de la ninhydrine (voir texte).



A B C

1,18897 g de cristaux de ninhydrine nous a donné, au cours de deux essais, les valeurs de :

$$d = 1{,}46$$
$$d = 1{,}459,$$

valeurs très compatibles avec celle de la densité théorique.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

Nous apportons les caractéristiques chromatographiques de la ninhydrique dans treize systèmes de phases solvantes différents, ainsi que trois procédés de révélation du spot de la tricétone. L'étude potentiométrique de la ninhydrine montre la fragilité de cette substance en milieu alcalin, à la suite d'une scission du cycle pentagonal et de la formation probable d'acide phénylglyoxal-*o*-carboxylique. Le spectre d'absorption infrarouge de la ninhydrine confirme la structure de tricétone vicinale hydratée à laquelle avaient conduit les recherches purement chimiques. Grâce à la diffraction des rayons X, on peut montrer que la ninhydrine cristallise dans le système monoclinique et qu'elle présente une hémiédrie énantiomorphe. La maille ($a = 11{,}96$ Å, $b = 6{,}04$ Å, $c = 5{,}81$ Å), bimoléculaire, correspond à une densité théorique de 1,50 que nous avons confirmée expérimentalement.

CHAPITRE II

QUELQUES NOUVEAUX DÉRIVÉS DE LA NINHYDRINE

La ninhydrine, tricétone de la série de l'indane, possède, comme nous l'avons vu plus haut, les propriétés chimiques de la fonction cétone; un certain nombre de dérivés fonctionnels de l'hydrate d'indanetrione ont déjà été décrits, notamment par RUHEMANN et par l'équipe des chimistes de l'Université Fouad.

Nous avons groupé dans ce chapitre la description de quelques nouveaux dérivés de la ninhydrine (*), obtenus par action :

— D'amines cycliques,
— De dérivés azotés de l'acide carbonique,
— De dérivés de l'hydrazine,
— De divers composés soufrés.

La présence dans la molécule de ninhydrine de trois fonctions cétoniques confère à ce produit une réactivité très grande; celle-ci, à de nombreuses reprises, nous a gêné dans notre expérimentation, comme elle avait jadis gêné RUHEMANN [387] qui, souvent, n'a pu obtenir que des mélanges de dérivés mono- et plurisubstitués.

I. — RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC QUELQUES AMINES CYCLIQUES

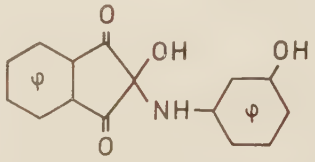
Nous avons voulu étendre la réaction de condensation de la ninhydrine avec l'aniline [387, 308], l'acide *p*-aminobenzoïque [308] et le *p*-aminophénol [308] à d'autres amines cycliques.

(*) Quelques produits cités dans ce chapitre ont déjà fait l'objet d'une note préliminaire [322].

Réaction de la ninhydrine avec le m-*aminophénol*

Cet aminophénol est employé comme intermédiaire dans la synthèse de nombreux colorants organiques.

La dissolution dans 65 ml d'eau de 5 mM de ninhydrine et d'un excès de *m*-aminophénol (7 mM) fournit, à froid, une coloration jaune intense bientôt suivie de l'apparition d'un précipité jaune que l'on recueille sur verre fritté. Après lavage à l'eau, on le recristallise dans l'alcool. L'analyse montre qu'il s'agit d'un produit de monosubstitution de la ninhydrine (I), auquel on peut assigner la formule ci-dessous :



en accord avec le schéma proposé par Moubasher [308].

Analyse : I, $C_{15}H_{11}O_4N$ (F = 257° C., Maquenne).

	% C	% H	% N
Calculé	66,91	4,11	5,19
Trouvé	67,48	4,22	4,98
	67,75	4,36	4,92

Ces cristaux, qui se présentent sous la forme de prismes microscopiques, sont solubles dans l'eau chaude, l'alcool et la soude diluée. On peut caractériser dans la solution aqueuse la fonction phénolique, grâce à la coloration brun-rouge obtenue sous l'action du perchlorure de fer.

Réaction de la ninhydrine avec l'α-naphtylamine

Le chauffage de la ninhydrine avec un excès d'α-naphtylamine donne lieu à des réactions différentes selon les conditions opératoires.

— En milieu acétique, on obtient une coloration verte qui, par chauffage, vire au jaune, à l'orangé puis au rouge. Le refroidissement permet d'isoler un précipité rouge non fluorescent (II) ; les tentatives de recristallisation amènent la décomposition de ce produit;

En milieu alcoolique, à froid, la coloration jaune initiale vire au vert puis au rouge, tandis qu'apparaît lentement un

précipité orangé formé de cristaux en oursins à fluorescence rouge (III) ;

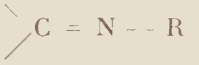
— Après réaction en milieu alcoolique, à chaud, on obtient un précipité formé d'aiguilles orangées à fluorescence rouge (qui semble identique à III) et de gros cristaux jaune soufre que l'on isole mécaniquement (IV).

L'analyse de ces trois produits nous a montré que leur constitution se rapproche de celle d'un produit de monosubstitution de la ninhydrine.

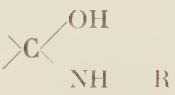
Analyse : $C_9H_6O_4$, $C_{10}H_9N$, — H_2O.

		% C	% H	% N
Calculé		75,24	4,29	4,62
	II	73,71	4,43	4,75
				4,64
Trouvé..	III	74,83	4,60	4,73
	·	74,64	4,42	4,74
	IV			4,48
				4,49

La diversité des produits doit être vraisemblablement rapportée aux différentes possibilités d'union de l'amine avec la ninhydrine; en effet, en plus de la cétimine :



et de l'amine substituée :



on peut penser que l'α-naphtylamine peut encore réagir au niveau du sommet 4, comme Pellizzari [341] l'a démontré pour une autre tricétone, l'alloxanne.

Réaction de la ninhydrine avec le naphtionate de sodium

Une solution aqueuse de ninhydrine à 1 p. 100, ajoutée à un égal volume de solution de naphtionate de sodium à 2 p. 100, donne une coloration jaune immédiate : la chromatographie de partage (*) montre qu'en dehors du naphtionate de sodium et de la ninhydrine qui n'ont pas pris part à la

(*) Voir les détails dans une communication présentée à la Société de Pharmacie de Bordeaux [327].

réaction, il n'existe qu'un spot jaune, à fluorescence jaune. Sur les chromatogrammes, la fluorescence de ce spot se modifie avec le temps, et après quelques jours on voit réapparaître à son niveau la fluorescence caractéristique du naphtionate de sodium : cette faible stabilité est bien en faveur de la formation primitive d'une base de Schiff.

Pour isoler ce composé fortement hydrosoluble, et par ailleurs très instable en milieu acide où il donne un précipité d'acide naphtionique, nous avons utilisé le relargage par le chlorure de sodium à partir de solutions aqueuses beaucoup plus concentrées. On obtient ainsi un précipité qui, après séchage, est épuisé par l'alcool absolu à deux reprises. Par refroidissement de la solution alcoolique, on obtient un précipité jaune à fluorescence jaune (V) qui se montre homogène en chromatographie, fournissant le même spot jaune que celui indiqué dans le mélange réactionnel initial. L'analyse, cependant, est loin de donner des résultats satisfaisants.

Analyse : V, $C_9H_6O_4$, $C_{10}H_8O_3NSNa$, 4 H_2O (— H_2O).

	% C	% H	% N	% S
Calculé	47,79	4,22	2,93	6,71
Trouvé	46,78	3,66	2,81	7,08
	46,76	3,77	3,06	7,26

Réaction de la ninhydrine avec l'α-aminopyridine

L'addition à 5 mM de ninhydrine, en solution dans 65 ml d'eau, d'un excès d'α-aminopyridine (8 mM) donne, à froid, une coloration puis un précipité jaunes; après lavage et recristallisation dans l'eau chaude, on obtient de petits prismes colorés en jaune (VI) pour lesquels nous adopterons une structure analogue à celle de I.

Analyse : VI, $C_{19}H_{10}O_3N_2$ (F = 211° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	66,13	3,96	11,02
Trouvé	66,11	4,29	11,40

II. — RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC QUELQUES DÉRIVÉS AZOTÉS DE L'ACIDE CARBONIQUE

Nous avons donné dans notre partie théorique la bibliographie complète des travaux antérieurement effectués dans ce domaine. Nos essais personnels ont porté sur la thiourée, la guanidine et deux de ses dérivés.

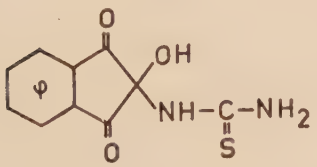
Réaction de la ninhydrine avec la thiourée

Nous avons effectué des essais en solution aqueuse et en solution sulfurique N/10 qui nous ont donné tous deux des résultats identiques. Le chauffage de la ninhydrine avec une quantité double de thiourée donne, après refroidissement, des cristaux blancs que l'on recristallise dans l'eau en présence de charbon. Le produit obtenu (VII) est soumis à l'analyse :

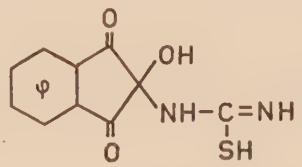
Analyse : VII, $C_{10}H_8O_3N_2S$ (F = 262° C.).

	% N
Calculé	11,86
Trouvé	11,88
	11,81

Deux formules répondent à cette analyse :



VII a



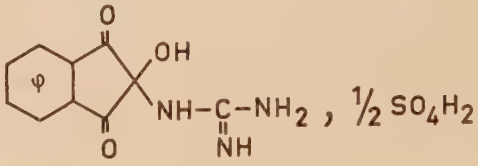
VII b

Nous optons pour la forme VII a, car si la thiourée avait réagi sous sa forme thiol (VII b), l'action réductrice sur la tricétone aurait été probablement la cause de la précipitation d'hydrindantine (voir plus loin, p. 109).

Réaction de la ninhydrine avec la guanidine

Le produit que nous avons obtenu en milieu sulfurique apparaît être le sel du composé antérieurement décrit par Ruhemann [388].

Le chauffage au bain-marie de ninhydrine et de carbonate de guanidine, en milieu sulfurique N, donne, à froid, des cristaux se présentant sous forme de tables cristallines (VIII). L'analyse, effectuée sans recristallisation, montre que le produit est constitué par un sulfate :



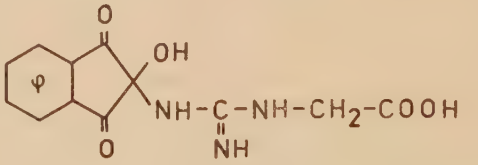
Analyse : VIII, $C_{20}H_{20}O_{10}N_6S$ (F = 293° C., déc.).

	% C	% H	% N
Calculé	44,77	3,75	15,66
Trouvé	44,44	3,77	15,81

Réaction de la ninhydrine avec la glycocyamine

La glycocyamine, ou acide guanidylacétique, tire son intérêt biologique de sa participation à la biosynthèse de la créatine.

La réaction avec la ninhydrine a été effectuée dans l'eau bouillante, en présence d'une quantité double du composé azoté. Le produit IX obtenu par refroidissement se montre peu soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool; il se dissocie vraisemblablement en milieu basique puisqu'il est soluble dans la soude en donnant une coloration jaune et dans l'ammoniaque en rouge, comme la ninhydrine elle-même.



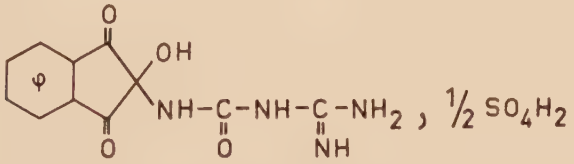
Analyse : IX, $C_{12}H_{11}O_5N_3$ (déc. = 260° C., F > 300° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	51,98	4,00	15,15
Trouvé	51,57	4,20	15,46
	51,20	4,15	15,58

Réaction de la ninhydrine avec la guanidylurée

Nous avons tout d'abord recristallisé dans l'eau (en présence de charbon) du sulfate de guanidylurée technique (*).

Le chauffage de la ninhydrine en milieu aqueux en présence d'un excès de ce produit, laisse apparaître, à chaud, un précipité blanc qu'on lave à l'eau bouillante (X), dans lequel on confirme la présence de sulfate par les réactions analytiques classiques.



Analyse : X, $C_{22}H_{22}O_{12}N_8S$ (F = 260° C., déc.).

	% N
Calculé	18,00
Trouvé	18,00
	18,16

III. — RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC QUELQUES DÉRIVÉS DE L'HYDRAZINE

La phénylhydrazine réagit directement avec la ninhydrine pour donner une dihydrazone, décrite pour la première fois par Ruhemann [387] ; la monohydrazone, comme nous l'avons signalé, ne peut être obtenue que par voie indirecte [514]. Ces données ne sauraient être étendues à tous les dérivés de l'hydrazine, car nous avons pu préparer directement divers dérivés monosubstitués de la ninhydrine entrant dans ce cadre. Parfois, la réaction s'avère plus complexe, et entraîne des cyclisations. Nous décrirons ci-dessous :

— Les dérivés obtenus avec diverses hydrazines,

— Les dérivés obtenus avec divers hydrazides,

— La réaction colorée fournie par la *p*-sulfophénylhydrazine.

(*) Aimablement fourni, par l'intermédiaire de M. le docteur Neuzil, par les Laboratoires de l'American Cyanamid Company, 30 Rockefeller Plaza, New York 20, N. Y.

A. — Réaction de la ninhydrine avec quelques hydrazines

Comme nous l'avons signalé au début de ce chapitre, la réactivité des trois fonctions cétoniques de la ninhydrine gêne, dans la plupart des descriptions ci-dessous, l'obtention d'un produit pur, la séparation du composé principal des composés plus substitués s'avérant laborieuse. Nous avons voulu cependant donner nos résultats expérimentaux que nous espérons pouvoir compléter dans l'avenir. La ninhydrine réagit non seulement avec le terme le plus simple de cette série, le sulfate d'hydrazine, mais encore avec des hydrazines substituées benzéniques ou hétérocycliques.

Réaction de la ninhydrine avec le sulfate d'hydrazine

Le chauffage en solution aqueuse de la ninhydrine avec un excès de sulfate d'hydrazine, après une coloration jaune initiale qui vire rapidement au rouge puis au brun, entraîne l'apparition d'un précipité brun que l'on recristallise dans l'eau chaude. Les cristaux obtenus (XI) se présentent au microscope sous la forme de branches brunâtres. L'analyse montre que la monohydrazone obtenue est légèrement souillée du composé disubstitué, d'où la teneur en azote supérieure à la concentration théorique.

Analyse : XI, $C_9H_6O_2N_2$.

	% C	% H	% N
Calculé	62,06	3,46	16,08
Trouvé	62,08	3,92	17,31
	62,47	3,90	17,15

Réaction de la ninhydrine avec la p-carboxyphénylhydrazine

Ce dérivé substitué de la phénylhydrazine a été préparé à partir de l'acide *p*-aminobenzoïque, selon la technique proposée par Veibel et Hauge [486] ; le chlorhydrate est mis au contact d'une quantité équimoléculaire de ninhydrine dans une solution aqueuse d'acétate de sodium; après une coloration jaune devenant bientôt orangée puis rouge, un précipité brun apparaît, que l'on recueille et recristallise dans l'acide acétique; ce précipité est constitué de très fines aiguilles cristallines (XII). Soluble dans les solutions diluées de carbonate de sodium et d'ammoniaque en donnant des colorations

respectivement vert olive et rouge, le produit se montre constitué par la monohydrazone.

Analyse : XII, $C_{16}H_{10}O_4N_2$ (F > 300° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	65,30	3,43	9,52
Trouvé	64,72	3,47	9,64

Réaction de la ninhydrine avec la dinitro-2,4-phénylhydrazine

Le mélange, à la température ambiante, de solutions équimoléculaires de ninhydrine et de dinitro-2,4-phénylhydrazine, toutes deux en solution dans HCl 2 N, s'accompagne immédiatement de la formation d'un précipité rouge, très peu soluble dans les solvants usuels, qui est lavé à l'eau chaude. Ce produit (XIII), d'aspect non cristallin au microscope, est constitué par la monohydrazone correspondante.

Analyse : XIII, $C_{15}H_8O_6N_4$ (F = 250° C., Maquenne).

	% N
Calculé	16,46
Trouvé	16,61

Nous avons essayé d'obtenir la dihydrazone en chauffant à reflux pendant deux heures, dans le même solvant, la ninhydrine avec un fort excès de dinitro-2,4-phénylhydrazine; le précipité que l'on recueille en fin d'opération (XIV) n'a pu être recristallisé en raison de son insolubilité quasi totale; l'analyse montre bien que la dihydrazone en est le constituant majeur, mais que le précipité n'est pas très homogène.

Analyse : XIV, $C_{21}H_{12}O_9N_8$ (F = 230° C., déc.).

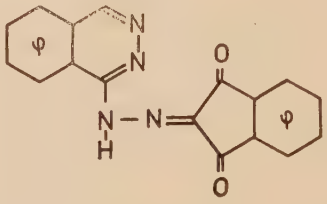
	% N
Calculé	21,53
Trouvé	19,76; 22,19; 22,01; 18,72.

Réaction de la ninhydrine avec l'hydrazino-1-phtalazine

L'hydrazino-1-phtalazine a retenu, ces dernières années, l'attention des biologistes et des médecins en raison de ses propriétés hypotensives (*); cette substance, sous la forme de

(*) Ce produit nous a été aimablement fourni par les Laboratoires Ciba, 57, quai d'Orsay, Paris, que nous sommes heureux de remercier ici; le médicament est spécialisé en France sous le nom d'Apressoline.

son monochlorhydrate, est facilement soluble dans l'eau; l'addition à cette solution d'une solution aqueuse de ninhydrine donne d'abord une coloration jaune, virant bientôt au rouge, puis un précipité brun que l'on recristallise dans l'alcool, d'où il précipite sous forme de petits oursins bruns (XV); il s'agit ici encore d'un monodérivé pour lequel nous proposons la formule ci-dessous :



Analyse : XV, $C_{17}H_{10}O_2N_4$ (F micro = 235° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	67,54	3,33	18,53
Trouvé	67,02	3,53	18,28

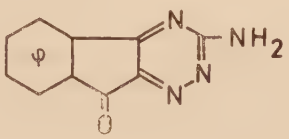
La réaction que fournit la ninhydrine avec la dihydrazino-1,4-phtalazine apparaît beaucoup plus complexe; cette substance, dont les propriétés pharmacodynamiques sont également intéressantes (*), est soluble dans l'eau à l'état de sulfate; la ninhydrine entraîne dans la solution aqueuse un précipité brun foncé que nous n'avons pas soumis à l'analyse, mais dont les colorations sont très variables selon le solvant utilisé; après séchage, le précipité donne en effet une solution violette dans l'alcool et l'acétone, rosée dans le sulfure de carbone et l'acétate d'amyle, rouge dans la pyridine et le chloroforme, orangée dans le benzène et le toluène. Ces modifications de coloration sont à rapprocher de celles décrites par Ciusa [85] pour certaines *p*-nitrophénylhydrazones.

Réaction de la ninhydrine avec l'aminoguanidine

Bien que l'aminoguanidine soit un dérivé azoté de l'acide carbonique, nous avons préféré rapprocher cette substance des hydrazines en raison de son affinité particulière pour les composés carbonylés.

(*) Produit Ciba 7441, spécialisé sous le nom de Népressol.

L'aminoguanidine possède, en plus des autres hydrazines, une propriété particulière, celle de réagir avec les α-dicétones vicinales pour donner naissance à des composés cycliques, les triazines asymétriques ou triazines-1,2,4 [109, 110] ; cette réaction s'effectuant de préférence dans l'acide acétique chaud, nous avons traité dans ce solvant 5 mM de chlorhydrate d'aminoguanidine et une quantité stoechiométrique de ninhydrine. La solution jaune orangé, après quatre-vingt-dix minutes de chauffage à reflux, puis refroidissement, est neutralisée à *p*H = 6 avec de l'ammoniaque; un produit brun s'insolubilise immédiatement et on laisse la précipitation se compléter en glacière; le produit marron obtenu est recristallisé dans la pyridine; les cristaux (XVI) répondent à la structure de l'aminotriazine suivante :



Analyse : XVI, $C_{10}H_6ON_4$ (F micro = 270° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	60,60	3,05	28,27
Trouvé	60,74	3,32	28,25

B. — Réaction de la ninhydrine avec quelques hydrazides

Les hydrazides, autres dérivés de l'hydrazine, possèdent vis-à-vis des composés carbonylés, une réactivité très voisine de celle des hydrazines : les produits ainsi obtenus sont des acylhydrazones, que nous préférons, avec Gautier et Pellerin [161], appeler des « hydrazidones ».

Réaction de la ninhydrine avec l'hydrazide stéarique

L'hydrazide stéarique a été préparé en faisant réagir un excès d'hydrate d'hydrazine sur l'oléate d'éthyle en milieu éthanolique : l'hydrazine produit à la fois la réduction de la liaison éthénique et l'hydrazinolyse du groupement ester [475 a].

La faible solubilité de l'hydrazide stéarique nous a amené à effectuer la réaction avec la ninhydrine en milieu éthanolo-

chloroformiqué. On obtient à froid un précipité jaune clair que l'on recristallise dans l'alcool. Ce produit (XVII) est une monohydrazidone, légèrement souillée du composé disubstitué.

Analyse : XVII, $C_{27}H_{40}O_3N_2$ (F micro = 74° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	73,59	9,11	6,35
Trouvé	73,16	9,41	7,30
	73,17	10,07	7,24

Réaction de la ninhydrine avec le benzhydrazide

Le benzhydrazide a été préparé selon la technique classique, à partir du benzoate de méthyle et recristallisé dans l'alcool.

La réaction avec la ninhydrine a été effectuée en solution dans HCl 2 N; un précipité cristallin de couleur jaune orangé se produit à froid; on ne le soumet pas à la recristallisation, qui en modifie la couleur. Ce produit (XVIII) est constitué par la monobenzhydrazidone de la ninhydrine.

Analyse : XVIII, $C_{16}H_{10}O_3N_2$ (F micro = 189° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	69,06	3,62	10,07
Trouvé	68,65	3,84	10,26

Réaction de la ninhydrine avec le salicylhydrazide

En suivant le même protocole que dans le paragraphe ci-dessus, nous avons préparé le salicylhydrazide, puis la monosalicylhydrazidone de la ninhydrine (XIX), produit légèrement souillé de dihydrazidone.

Analyse : XIX, $C_{16}H_{10}O_4N_2$ (F micro = 240° C., déc.).

	% C	% H	% N
Calculé	65,30	3,42	9,52
Trouvé	64,61	3,77	9,81
	64,37	3,71	9,73

Réaction de la ninhydrine avec l'isonicotinylhydrazide

L'action de ce tuberculostatique sur la tricétone a déjà fait l'objet d'une brève mention de Neuzil [320]. Le produit

obtenu à froid par cet auteur, constitué par des plaques cristallisées faiblement colorées en jaune, se décompose au cours des essais de recristallisation. Aussi l'avons nous simplement recueilli et séché sous vide sur des pastilles de soude (afin d'éviter toute vapeur acide). L'analyse élémentaire plaide en faveur d'un composé de structure hydrazinique (XX).

Analyse : XX, $C_{15}H_{11}O_4N_3$ (F = 214° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	60,60	3,73	14,13
Trouvé	60,48	3,89	13,90

Si l'on fait réagir l'isonicotinylhydrazide sur la ninhydrine, toujours en proportions stoechiométriques, dans l'acide acétique bouillant, on observe une réaction nettement plus complexe : la coloration orangée initiale vire au rouge puis au brun, tandis qu'un anneau vert est visible en surface; par refroidissement, on observe un précipité en houppes cristallines crème, souillé d'un produit brun foncé; ce dernier composé peut être éliminé grâce à sa solubilité dans le benzène bouillant. Il recristallise de ce solvant en aiguilles rouges, qui sont insolubles dans l'eau et se dissolvent dans la soude en donnant une solution orangée; il semble donc que de la bis-dicétoindanyle se soit formée au cours de la réaction.

Les houppes cristallines crème sont recristallisées dans l'alcool absolu d'où elles précipitent sous la forme de longues aiguilles soyeuses enchevêtrées (XXI) ; l'analyse montre qu'il s'agit de l'isonicotinylhydrazidone de la ninhydrine.

Analyse : XXI, $C_{15}H_9O_3N_3$ (F = 214° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	64,51	3,23	15,04
Trouvé	64,71	3,44	15,86
	64,72	3,69	15,50

Réaction de la ninhydrine avec le phényl-4-semicarbazide

Lorsqu'on met en présence les deux composés, en proportions stoechiométriques dans l'eau froide, on observe une coloration jaune, puis orangée, suivie de l'apparition d'un précipité également orangé; ce précipité (XXII), lavé à l'eau, n'apparaît pas homogène à l'analyse; le monodérivé qui en

forme la plus grande partie apparaît nettement souillé par le composé disubstitué.

Analyse : XXII, $C_{16}H_{11}O_3N_3$ (F = 97° C.).

	% C	% H	% N
Calculé	65,52	3,78	14,32
Trouvé	63,18	4,48	14,93
	63,54	4,35	14,91

Ce résultat analytique nous a conduit à essayer de préparer la bis-phénylsemicarbazone, en chauffant dans l'eau à reflux, pendant quinze minutes, la ninhydrine avec un excès de chlorhydrate de phényl-4-semicarbazide. Le précipité cristallin jaune obtenu par refroidissement (XXIII), recristallisé dans l'alcool à 50°, correspond au produit recherché.

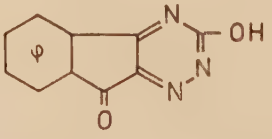
Analyse : XXIII, $C_{25}H_{18}O_3N_6$.

	% C	% H	% N
Calculé	64,78	4,25	19,71
Trouvé	64,45	4,71	19,16
	64,18	4,60	19,69

Réaction de la ninhydrine avec le semicarbazide

Le semicarbazide manifeste vis-à-vis des tricétones vicinales une action voisine de celle de l'aminoguanidine et conduit également à la formation de triazines asymétriques.

Aussi avons-nous condensé directement les deux produits au sein de l'acide acétique. Après une heure d'ébullition à reflux, la solution jaune est neutralisée à *p*H = 6 avec de la soude et mise en glacière; le précipité qui prend naissance est recristallisé dans l'eau (XXIV).

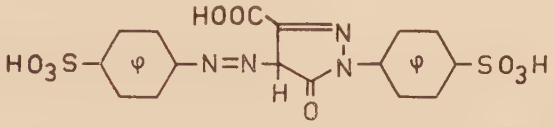


Analyse : XXIV, $C_{10}H_5O_2N_3$, H_2O (F micro = 234° C., déc.).

	% C	% H	% N
Calculé	55,30	3,24	19,35
Trouvé	55,00	3,42	19,84
	54,46	3,27	19,74

C. — Réaction colorée de la ninhydrine avec la *p*-sulfophénylhydrazine

La *p*-sulfophénylhydrazine est une substance qui a marqué une date importante dans l'histoire des colorants : c'est en effet en 1884 que Ziegler [532] démontra que cette phénylhydrazine substituée se condense avec l'acide dihydroxytartrique pour donner un colorant acide jaune auquel fut donné le nom de tartrazine :



La *p*-sulfophénylhydrazine donne une coloration jaune avec d'autres produits, notamment l'acide ascorbique [29]. Nous avons remarqué qu'une solution aqueuse de cette hydrazine, mélangée à froid avec une solution aqueuse de ninhydrine, donnait rapidement naissance à une coloration rouge. Nous avons étudié plus en détail cette réaction colorée.

Etude de la réaction colorée

L'apparition de la coloration rouge s'effectue dans une large gamme de températures : toutefois, les teintes obtenues au bain-marie à 100° C. apparaissent moins franchement rouges que celles obtenues à température ambiante, les solutions possédant un reflet jaunâtre. La solution de *p*-sulfophénylhydrazine apparaît nettement acide (*p*H = 2,4) ; si l'on effectue la réaction en milieu neutre ou en milieu légèrement alcalin, on observe des modifications de teintes importantes par rapport aux réactions effectuées en milieu acide (tableau III).

Les différences obtenues en milieu alcalin proviennent vraisemblablement de la réaction de la *p*-sulfophénylhydrazine avec les produits de scission de la ninhydrine.

Quoi qu'il en soit, nous avons surtout retenu de ces essais l'apparition d'une coloration *rouge franc* en milieu *acide* et à froid; ces conditions différencient d'ailleurs la réaction que donne la *p*-sulfophénylhydrazine avec la ninhydrine de celle que fournit cette hydrazine avec différents alcools, aldéhydes [144] et oses, en milieu alcalin [497].

TABLEAU III

RÉACTION *p*-SULFOPHÉNYLHYDRAZINE-NINHYDRINE EN MILIEU TAMPONNÉ.

(Concentration en ninhydrine : 0,16 p. 100;
Concentration en *p*-sulfophénylhydrazine : 0,08 p. 100;
Chauffage au bain-marie : trente minutes.)

*p*H		Coloration
1,97	3,01	jaune-rouge
4,7	4,86	brun (trouble)
5,23		violet (trouble)
6,18		rouge violacé
6,67	7,35	rouge
7,95	8,42	rouge
10,66		jaune clair

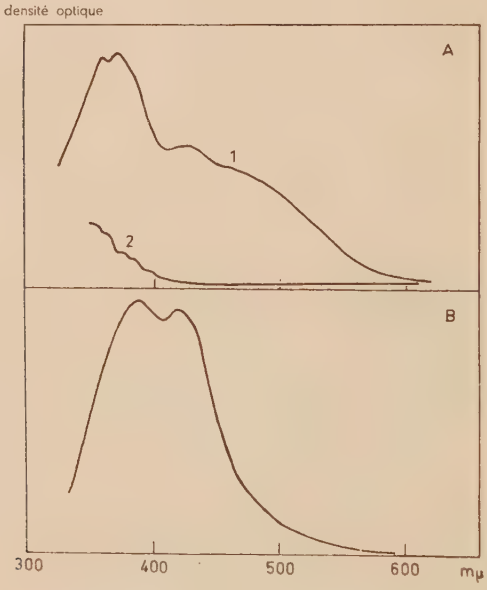


FIG. 6.

Réaction ninhydrine-*p*-sulfophénylhydrazine.
Spectres d'absorption.

A. — Réaction à froid : 1, ninhydrine-*p*-sulfophénylhydrazine; 2, *p*-sulfophénylhydrazine;

B. — Réaction à chaud (trente minutes au bain-marie).

La solution aqueuse renferme 0,5 p. 100 des deux produits et a été diluée à 10^{-3} pour l'étude spectrophotométrique.

On trouvera sur la figure 6 les spectres d'absorption des mélanges réactionnels obtenus à froid et à chaud, dans la gamme 300-700 mμ.

On remarque, pour la réaction effectuée à froid, deux maximums, l'un à 374 mμ et l'autre, moins important, à 427 mμ; ces valeurs passent respectivement à 378 mμ et à 420 mμ quand la réaction est effectuée à chaud.

Spécificité de la réaction

Cette coloration rouge semble assez caractéristique de la ninhydrine, car d'autres composés voisins ne donnent lieu à aucune coloration comparable : la phényl-2-indanedione-1,3, la nitro-2-indanedione-1,3, l'hydrindantine, l'indanedione-1,3 ne donnent pas de coloration ou une coloration jaune; des composés carbonylés comme l'alloxanne, l'acide ascorbique, le β-naphtoquinone-sulfonate de sodium, l'isatine, le rhodizonate de sodium, la cyclohexanedione-1,2, le diacétyle, l'α-pyrrolidone et la polyvinyl-pyrrolidone ne fournissent jamais de pigment rouge par chauffage avec la *p*-sulfophénylhydrazine. Seule la dibromo-2,2-indanedione-1,3 donne une réaction voisine.

Sensibilité

En vue de l'application de cette réaction à l'identification de la ninhydrine sur les chromatogrammes, nous avons étudié tout d'abord la sensibilité sur papier. La pulvérisation d'une solution à 1 p. 100 de *p*-sulfophénylhydrazine dans l'eau, suivie d'un léger chauffage à l'étuve à 100° C. (cinq minutes) permet de déceler 0,1 μg de la tricétone.

En milieu liquide et à froid, la coloration augmente progressivement; après trois heures, nous avons noté que la densité optique des solutions suit la loi de Beer dans la région de 1,78 μg/ml à 16 μg/ml, que la mesure spectrophotométrique soit effectuée à 374 ou à 427 mμ, la première valeur étant évidemment plus intéressante.

Cette réaction colorée peut donc être appliquée au dosage spectrophotométrique de la ninhydrine.

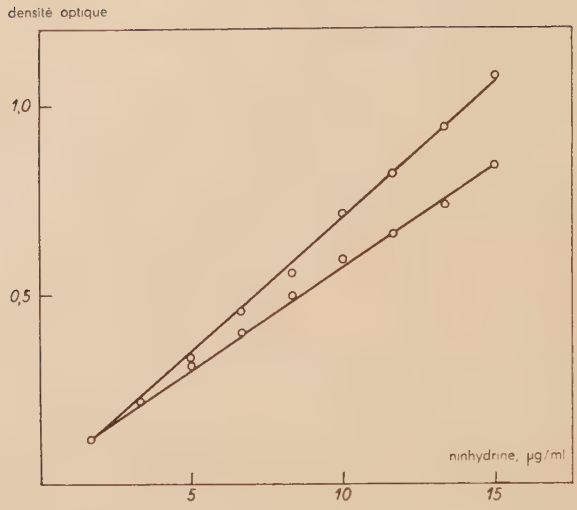


FIG. 7.

Réaction de la ninhydrine
avec la *p*-sulfophénylhydrazine.

Densité optique après trois heures, lue à 374 (courbe supérieure) ou à 427 mμ (courbe inférieure); solution de *p*-sulfophénylhydrazine à 89 γ/ml; réaction à froid; cuves de 1 cm.

Etude chromatographique

Les modifications de la coloration rouge, selon que l'on opère à froid ou à chaud, nous ont fait suspecter l'apparition de plusieurs pigments au cours de la réaction ninhydrine-*p*-sulfophénylhydrazine; c'est ce que nous a effectivement confirmé la chromatographie de partage.

Avec différentes phases solvantes et des mélanges réactionnels effectués dans différentes conditions opératoires, nous avons toujours observé l'existence de trois spots colorés :

— Un spot jaune (J), qui absorbe la lumière ultra-violette;

— Un spot rouge (R), à fluorescence rouge;

— Un second spot jaune (j), toujours situé immédiatement sous le spot R, migrant partiellement avec lui, d'où son aspect orangé sur certains chromatogrammes; ce spot j est bien moins important que les deux autres et n'est visible que lorsqu'on surcharge le spot de départ.

Dans le tableau suivant, nous donnons les caractéristiques chromatographiques des deux spots principaux.

TABLEAU IV

CHROMATOGRAPHIE DE LA RÉACTION NINHYDRINE - *p*-SULFOPHÉNYLHYDRAZINE. CHROMATOGRAPHIE ASCENDANTE; PAPIER SCHLEICHER ET SCHÜLL 2043 b.

	PHASE SOLVANTE	Rf	
		J	R
A	Phénol/eau (80 : 20)	0,71	0,31
B	Isopropanol/eau (85 : 15)	0,28	0,06
C	*n*-Propanol/ac. acétique N (3 : 1)	0,51	0,23
D	Ethanol/*n*-butanol/eau (1 : 2 : 2)	0,67	0,58
E	*n*-Butanol/ac. acétique/eau (78 : 5 : 17)	0,16	0,03
F	Acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2)	0,58	0,39
G	Méthanol/alcool isoamylique/benzène/eau (2 : 1 : 1 : 1)	0,70	0,61
H	Chlorure de sodium 30 p. 1.000	0,24	0,01

Les systèmes D et E nous ont paru particulièrement intéressants et ont été les seuls utilisés par la suite .

La chromatographie nous a permis d'étudier le spectre des trois colorants J, R et j. Pour ce faire, nous avons préparé les solutions suivantes :

— Ninhydrine ..... solution 0,01 M.. 4,5 ml
— *p*-Sulfophénylhydrazine ... solution 0,01 M.. 5 ml
— Eau ..... 0,5 ml.

Après deux jours de séjour à la température de 29° C., nous avons réalisé la séparation chromatographique avec la phase solvante D, sur papier Schleicher et Schüll 2043 b. Les spots ont été élués du papier par l'eau distillée. Nous donnons ci-dessous le spectre d'absorption des trois colorants, avec une échelle de densité optique arbitraire et non obligatoirement comparable pour les trois produits.

La chromatographie nous a permis de constater, par des essais comparatifs, que les pigments sont formés en plus grande abondance quand la réaction est effectuée à chaud, cette augmentation étant surtout marquée pour le colorant jaune principal. L'influence des proportions relatives de ninhy-

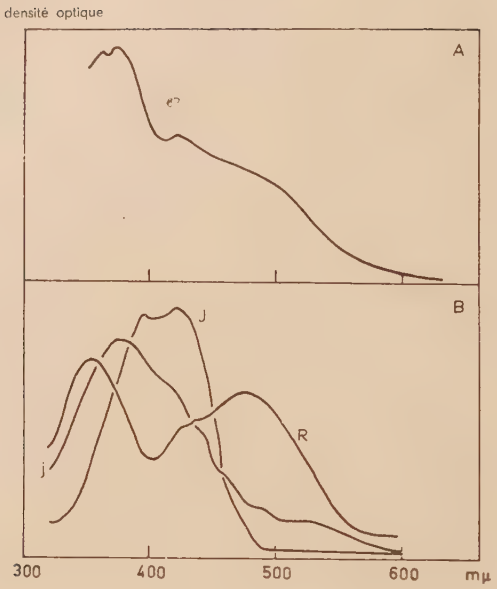


Fig. 8.

Réaction ninhydrine-*p*-sulfophénylhydrazine.

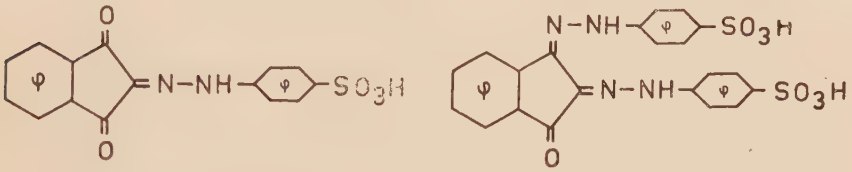
A : spectre d'absorption de la réaction globale à froid;

B : spectres d'absorption des pigments isolés par chromatographie (voir texte).

drine et d'hydrazine a été également examinée : en présence d'un excès du composé azoté, on observe, à froid comme à chaud, la prédominance du composé rouge. L'influence du *p*H que nous avons signalée ci-dessus peut être également suivie par la chromatographie : en milieu neutre, le spot R diminue considérablement, tandis que le spot sous-jacent j apparaît plus important.

Pour chercher à identifier les différents pigments, nous avons essayé de les isoler sous la forme d'un sel métallique. L'addition de chlorure de baryum au mélange réactionnel permet, après séjour en glacière, de recueillir un précipité brun-rouge; la chromatographie du précipité, ou du liquide obtenu par décomposition de ce sel de baryum, nous a encore montré l'existence de deux constituants majeurs jaune et rouge, de même que la chromatographie du précipité obtenu par relargage au chlorure de sodium du mélange réactionnel.

L'hydrosolubilité plus grande du pigment rouge, traduite par la valeur plus faible de son Rf, l'obtention d'une quantité supérieure de ce même pigment quand on augmente la proportion de *p*-sulfophénylhydrazine, nous amènent à émettre l'hypothèse que le pigment jaune serait constitué par la mono-*p*-sulfophénylhydrazone, tandis que le composé rouge serait un dérivé disubstitué.



Le composé j, de Rf toujours voisin de celui du pigment rouge, en raison de son augmentation en milieu alcalin, pourrait être une forme tautomérique de ce dernier.

IV. — RÉACTION DE LA NINHYDRINE AVEC DEUX COMPOSÉS SOUFRÉS

L'action de la ninhydrine sur les composés soufrés, et tout spécialement sur le groupement — SH, n'a encore donné lieu qu'à un nombre assez restreint de recherches. Rappelons la description du produit de condensation de la ninhydrine et de la cystéine [249], l'action thioloprive sur les protéines [163, 171, 457, 370] ainsi que sur différents composés soufrés, cette dernière étude ayant été réalisée par Tayeau, Marquevielle et Marquevielle-Régnier [456]. Nous avons étudié nous-même, dans ce même chapitre, l'action de la ninhydrine sur la thiourée, qui ne semble d'ailleurs pas réagir par son atome de soufre.

Les deux réactions que nous décrivons ci-dessous nous ont permis de démontrer l'action thioloprive de la ninhydrine sur des thiols en mettant en évidence la formation du disulfure correspondant, tandis que la ninhydrine est réduite en hydrindantine.

Réaction de la ninhydrine avec la cystéinamine

La cystéinamine, ou mercaptoéthylamine, correspond au produit de décarboxylation de la cystéine; cette amine est

passée depuis quelques années au premier plan des préoccupations des biologistes, en raison de sa présence dans le coenzyme d'acétylation de Lippman, de ses propriétés protectrices vis-à-vis des radiations ionisantes [25, 173] et de ses propriétés anti-inflammatoires [262, 263].

Nous avons ajouté à une solution neutre de cystéinamine (*), une solution aqueuse renfermant une quantité stoechiométrique de ninhydrine : on observe, dès le mélange, une coloration rouge foncé qui disparaît progressivement pour laisser place à une coloration jaune rosé puis à un précipité blanc.

Ce précipité, recristallisé dans l'acétate d'éthyle, s'est montré, par l'analyse, son point de fusion et ses propriétés, constitué par de l'hydrindantine, produit de réduction de la ninhydrine. Cette réduction n'a été possible que par la transformation de la cystéinamine en disulfure correspondant, c'est-à-dire en cystamine, diamine que nous retrouverons dans le chapitre suivant. Nous avons effectivement caractérisé la cystamine dans les eaux mères, au moyen de la chromatographie de partage (système *n*-butanol/pyridine/eau, 1 : 1 : 1; Rf = 0,43).

Il convient de remarquer la différence entre la cystéine et son amine; ceci provient, comme nous le verrons bientôt en étudiant la réaction ninhydrine-aminoacide, de la plus grande réactivité avec la tricétone des aminoacides par rapport aux amines qui en dérivent.

Réaction de la ninhydrine avec le méthyl-1-mercapto-2-imidazole

Ce thiol hétérocyclique (**) est utilisé en thérapeutique comme substance antithyroïdienne [438].

On dissout ce produit dans l'acide chlorhydrique N et on ajoute une solution de ninhydrine dans ce même solvant. Il se forme immédiatement un précipité cristallin blanc qui s'avère également être de l'hydrindantine. Comme dans l'expérience précédente, nous avons donc cherché à mettre en évidence le disulfure correspondant dans les eaux mères. Ce disulfure ne semblant pas avoir été décrit dans la littérature, nous avons oxydé par H_2O_2 à 10 volumes une solution de

---

(*) Aimablement fournie par les Laboratoires Labaz; voir note p. 162.

(**) Nous remercions la Société des Antibiotiques de France, 178, avenue du Président-Wilson, La Plaine-Saint-Denis (Seine), qui, par l'intermédiaire du docteur Neuzil, nous a procuré ce produit.

méthyl-1-mercapto-2-imidazole, procédé classique pour l'obtention des dérivés d'oxydation des thiols de cette série; la chromatographie de partage [en phénol-eau (80 : 20) ou en propanol/ac. acétique N (3 : 1)] de cette dernière solution nous a donné une image identique à celle des eaux mères de notre expérience.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Dans la première section de ce chapitre, nous décrivons les produits de condensation de la ninhydrine avec quelques amines cycliques : *m*-aminophénol, α-naphtylamine, naphtionate de sodium et α-aminopyridine.

Nous examinons ensuite la réaction de la ninhydrine avec quelques dérivés azotés de l'acide carbonique, ce qui nous a permis de préparer les cétimines de la thiourée, de la guanidine (sulfate), de la glycocyamine et de la guanidylurée.

La troisième section renferme les essais réalisés dans le cadre de la réaction ninhydrine - dérivés de l'hydrazine; les monohydrazones de l'hydrazine, de la *p*-carboxyphénylhydrazine, de la dinitro-2,4-phénylhydrazine, de l'hydrazino-1-phtalazine, ainsi que la dihydrazone de la dinitro-2,4-phénylhydrazine ont pu ainsi être préparées. L'aminoguanidine donne lieu à une réaction plus complexe qui conduit à une triazine asymétrique. Les hydrazides réagissent également avec la tricétone : nous décrivons les produits obtenus avec les hydrazides stéarique, benzoïque, salicylique, isonicotinique, le phényl-4-semicarbazide; le semicarbazide, comme précédemment l'aminoguanidine, donne naissance à une triazine à la suite d'une cyclisation. Nous terminons l'étude des dérivés de l'hydrazine en consacrant quelques pages à la réaction colorée fournie par la *p*-sulfophénylhydrazine.

La dernière partie de ce chapitre consiste en l'examen de l'action de deux thiols, la cystéinamine et le méthyl-1-mercapto-2-imidazole, qui réduisent tous les deux la ninhydrine.

CHAPITRE III

RECHERCHES SUR LA RÉACTION NINHYDRINE-AMINOACIDES

Dans la première partie de ce travail, nous avons consacré une section entière à l'exposé des travaux si nombreux ayant trait à l'action de la ninhydrine sur les aminoacides, réaction à laquelle la ninhydrine doit essentiellement sa diffusion dans les laboratoires de biochimie. L'importance de cette réaction, en dehors de ses multiples applications analytiques, provient du fait que la dégradation des aminoacides par la ninhydrine constitue, comme nous l'avons vu, un exemple typique de réaction de Strecker, et que cette réaction de Strecker rentre elle-même dans le cadre plus vaste des réactions aminoacides - composés carbonylés : on sait en effet, depuis fort longtemps, que les aminoacides réagissent avec le formol [318, 73, 154, 344], les oses [199, 229] et divers composés aldéhydiques [447, 374, 375, 105, 376].

Nos recherches personnelles ont porté sur la cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides en milieu hydro-organique, et plus spécialement en présence d'alcool butylique tertiaire. Nous avons pu ainsi mettre au point un protocole expérimental qui nous a permis d'étudier comparativement le comportement de divers aminoacides vis-à-vis de la tricétone.

Nous exposerons ensuite quelques essais d'analyse chromatographique et microcristalloscopique de cette réaction.

Section I

La réaction ninhydrine-aminoacides en présence de différents alcools

De nombreux chercheurs utilisent, en vue du dosage des aminoacides, la coloration que fournissent ces principes immédiats biologiques avec la ninhydrine : ils effectuent habituellement la réaction en milieu aqueux et à chaud. C'est qu'en effet, comme nous le verrons bientôt, l'apparition du pigment bleu ne s'effectue à froid qu'en présence de concentrations assez importantes des réactifs en présence. L'évolution des techniques analytiques a amené, au cours de ces dernières années, l'utilisation de solvants organiques comme milieux réactionnels, que ces solvants aient été proposés pour maintenir le milieu à un *p*H favorable (acide acétique, pyridine), pour solubiliser l'hydrindantine ajoutée ou formée *in situ* par réduction de la ninhydrine (méthylcellosolve), ou encore pour éluer les aminoacides adsorbés sur les résines échangeuses d'ions ou sur le papier des chromatogrammes.

Au cours de nos expériences, nous avons remarqué que l'addition d'éthanol à la solution aqueuse renfermant la ninhydrine et l'aminoacide entraîne un effet favorable sur la vitesse d'apparition de la coloration. Il nous a semblé intéressant d'apporter des précisions sur ce phénomène, et nous relaterons nos essais sous les rubriques suivantes :

I. — Recherche d'un protocole;

II. — Etude comparée de l'influence de différents alcools aliphatiques.

III. — Etude particulière de l'influence de l'alcool butylique tertiaire.

I. — RECHERCHE D'UN PROTOCOLE

Puisque l'éthanol manifeste un effet favorable sur la vitesse d'apparition du pigment bleu violacé, il était avantageux de sélectionner des conditions opératoires dans lesquelles, en son absence, la réaction colorée ne se développe pas à la température du laboratoire. Le colorant étant, en majeure partie du moins, constitué par le pourpre de Ruhemann, la mesure spectrophotométrique du pigment à son maximum

d'absorption (570 mμ) [369, 283], effectuée en fonction du temps, nous a semblé une méthode commode pour évaluer la cinétique de la réaction. Pour des raisons pratiques, cette étude a été limitée aux trois premières heures de la réaction, les mesures étant effectuées toutes les quinze minutes, dans une pièce climatisée dont la température ne varie que très faiblement autour de la valeur moyenne de 21,5° C. Nous avons pris soin de maintenir à l'obscurité tous les mélanges examinés. Nous avons utilisé le spectrophotomètre Unicam SP 500; les mesures sont effectuées dans des cuves de 1 cm, l'ouverture de fente réglée à 0,05 mm.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides en milieu aqueux

Les essais suivants ont été réalisés dans une solution aqueuse de tampon

PO_4H_2K M/120 + PO_4HNa_2 M/120, de *p*H = 6,75.

Nous avons toujours utilisé une quantité de ninhydrine stoechiométriquement double de celle de l'aminoacide mis en œuvre, puisque la formation d'une molécule de DYDA à partir d'un aminoacide nécessite au minimum la mise en œuvre de deux molécules de ninhydrine. Les mélanges suivants ont été réalisés, avec le glycocolle et la DL-alanine.

Expérience n°		Concentration en ninhydrine (μM/ml)	Concentration en aminoacide (μM/ml)
Glycocolle	DL-alanine		
I	I a	0,78125	0,390625
II	II a	1,5625	0,78125
III	III a	3,125	1,5625
IV	IV a	6,25	3,125
V	V a	12,5	6,25
VI	VI a	25	12,5
VII	VII a	50	25
VIII	VIII a	100	50

Après trois heures, nous n'avons observé aucune modification de la densité optique dans les mélanges :

I, II et III;
I a, II a, III a et IV a.

A l'autre extrémité de la gamme, la coloration bleu violacé intense obtenue à la quinzième minute (première lecture) dépassait les limites de sensibilité de notre appareil pour les mélanges VII, VIII et VIII a.

Les résultats intermédiaires sont inclus dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU V

Cinétique de l'apparition de la DYDA en milieu aqueux. (Densité optique en fonction du temps.)

t minutes	IV	V	VI	V a	VI a	VII a
15	0	0,032	0,380	0	0,043	0,840
30	0	0,056	1,022	0	0,081	»
45	0	0,069	»	0	0,115	»
60	0	0,103	»	0	0,175	»
75	0	0,134	»	0	0,270	»
90	0,001	0,177	»	0	0,382	»
105	0,002	0,229	»	0,003	0,538	»
120	0,002	0,300	»	0,005	0,760	»
135	0,003	0,387	»	0,005	»	»
150	0,003	0,480	»	0,007	»	»
165	0,004	0,610	»	0,010	»	»
180	0,004	0,770	»	0,012	»	»

Ces résultats sont illustrés par le graphique de la figure 9.

Notons que les courbes montrant le développement de la coloration en fonction du temps, présentent une concavité supérieure. En phase aqueuse, la vitesse de formation de la DYDA n'est pas constante : elle augmente en fonction du temps. Remarquons également la réactivité plus marquée du glycocolle avec la ninhydrine par rapport à l'alanine. Nous reviendrons plus loin sur le comportement des différents aminoacides. Retenons simplement que les résultats précédents nous permettent de sélectionner, pour l'étude de l'influence des solvants organiques, les protocoles I, II et III qui nous donnent l'assurance d'un équivalent nul en milieu pure-

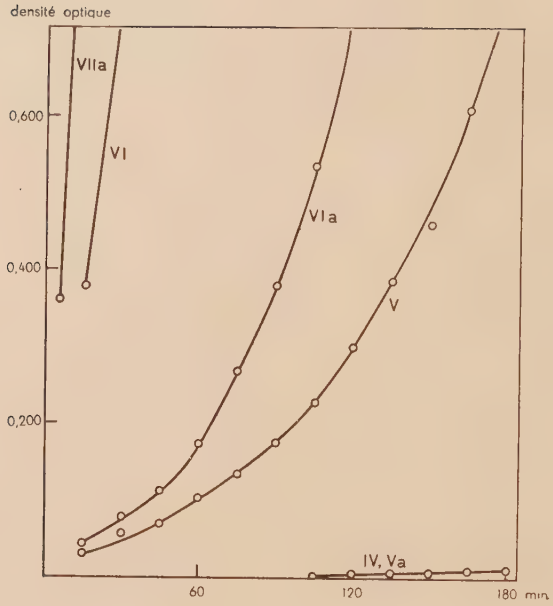


Fig. 9.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en milieu aqueux.
(Densité optique en fonction du temps.)

ment aqueux. La même réaction, effectuée selon le protocole III, en remplaçant l'eau par de l'alcool éthylique à 60 p. 100, montre l'apparition d'une coloration bleue bien visible.

II. — ÉTUDE COMPARÉE DE L'INFLUENCE DE DIFFÉRENTS ALCOOLS ALIPHATIQUES

Nous avons voulu savoir si l'action de l'éthanol était spécifique ou bien si d'autres alcools la partagaient. Nos essais nous ont rapidement montré qu'il s'agissait d'une propriété générale commune à de nombreux solvants, parmi lesquels l'alcool butylique tertiaire (méthyl-2-propanol-2 ou triméthylcarbinol) occupait une place de choix.

Les solvants organiques que nous avons employés sont les suivants :

Alcool	Origine	Purification
Méthanol	Merck	Méthode au magnésium (voir Vogel [494], p. 168).
Ethanol absolu	Prolabo	En ampoules scellées, utilisé tel quel.
n-Propanol	Merck	Redistillé (E = 97,5° C.).
Isopropanol	Prolabo	Débarrassé des peroxydes par Cl_2Sn (voir Vogel [494], p. 818).
n-Butanol-1	Merck	Redistillé (E = 117° C.).
n-Butanol-2	Prolabo	Redistillé (E = 99° C.).
Isobutanol (méthyl-2-propanol-1)	Prolabo	Redistillé (E = 107° C.).
Butanol tertiaire (méthyl-2-propanol-2)	Prolabo	Distillation fractionnée (E = 82° C.) de la fraction la plus facilement congelable.
Alcool amylique tertiaire (méthyl-2-butanol-2)	Prolabo	Redistillé (E = 102° C.).
Butanediol-1,4	Fluka	Puriss., utilisé tel quel.
Méthylcellosolve (méthoxy-2-éthanol ou éther monométhylique du glycol éthylénique)	Fluka	Puriss., utilisé tel quel.
Cellosolve (éthoxy-2-éthanol ou éther monoéthylique du glycol éthylénique)	Fluka	Puriss., utilisé tel quel.

Expériences en milieu alcoolique 75 p. 100

Nous avons tout d'abord voulu comparer les alcools méthylique, éthylique, *n*-propylique, butylique tertiaire, le méthylcellosolve et le cellosolve avec le protocole suivant :

Glycocolle ..... 1,5625 µM/ml;
Ninhydrine ..... 3,125 µM/ml;
Alcool ..... 75 p. 100 du volume total;
PO_4HNa_2..... M/120;
PO_4H_2K..... M/120.

Nous nous sommes aperçu que ce protocole n'était pas réalisable avec l'éthanol, le méthylcellosolve et le cellosolve, car

les mélanges ainsi réalisés ne sont pas homogènes. Nous ne donnerons ci-dessous que les résultats relatifs au méthanol (IX), au *n*-propanol (X) et à l'alcool butylique tertiaire (XI) ; ce dernier produit manifeste une action favorisante intense.

TABLEAU VI

Système ninhydrine-glycocolle.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence des alcools méthylique (IX), *n*-propylique (X) et butylique tertiaire (XI).

(Densité optique en fonction du temps.)

t minutes	IX	X	XI
15	0,004	0,037	0,144
30	0,006	0,047	0,280
45	0,007	0,058	0,416
60	0,008	0,074	0,550
75	0,010	0,093	0,675
90	0,013	0,114	»
105	0,016	0,135	»
120	0,020	0,160	»
135	0,024	0,187	»
150	0,028	0,211	»
165	0,033	0,238	»
180	0,038	0,276	»

Fig. 10.

Système ninhydrine-glycocolle.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence des alcools méthylique (IX), *n*-propylique (X) et butylique tertiaire (XI). (Densité optique en fonction du temps.)

Afin de pouvoir étudier l'éthanol qui a servi de départ à nos observations, ainsi que d'autres alcools, nous avons été amené à effectuer de nouveaux essais en abaissant la teneur du milieu en solvant organique à la valeur de 60 p. 100.

Expériences en milieu alcoolique 60 p. 100

Le protocole utilisé est le même que celui du paragraphe précédent, en dehors de la teneur plus faible en alcool. Des essais ont été réalisés avec le méthanol (XII), l'éthanol (XIII), l'isopropanol (XIV), le méthylcellosolve (XV), le cellosolve (XVI), le butanediol-1,4 (XVII) et l'alcool butylique tertiaire (XVIII).

TABLEAU VII

Système ninhydrine-glycocolle.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence des alcools méthylique (XII), éthylique (XIII), isopropylique (XIV), de méthylcellosolve (XV), de cellosolve (XVI), de butanediol-1,4 (XVII) et d'alcool butylique tertiaire (XVIII).

t minutes	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII
15	0,007	0,011	0,020	0	0	0,009	0,038
30	0,008	0,014	0,043	0	0	0,013	0,070
45	0,009	0,019	0,065	0,001	0,002	0,021	0,095
60	0,011	0,026	0,091	0,008	0,003	0,035	0,125
75	0,014	0,033	0,116	0,017	0,005	0,043	0,155
90	0,018	0,041	0,140	0,025	0,007	0,058	0,181
105	0,021	0,052	0,168	0,037	0,012	0,073	0,211
120	0,025	0,060	0,194	0,049	0,013	0,097	0,240
135	0,031	0,071	0,218	0,060	0,015	0,110	0,269
150	0,036	0,083	0,243	0,075	0,018	0,130	0,299
165	0,042	0,095	0,268	0,087	0,023	0,150	0,330
180	0,049	0,110	0,293	0,100	0,023	0,172	0,358

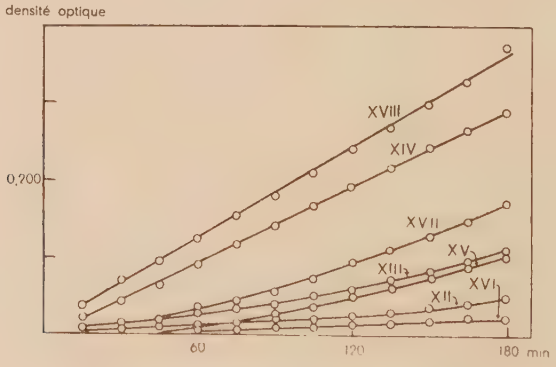


Fig. 11.

Système ninhydrine-glycocolle.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence des alcools méthylique (XII), éthylique (XIII), isopropylique (XIV), de méthylcellosolve (XV), de cellosolve (XVI), de butanediol-1,4 (XVII) et d'alcool butylique tertiaire (XVIII).

Ces résultats nous permettent déjà de tirer quelques conclusions :

— L'alcool butylique tertiaire, à cette nouvelle concentration, manifeste toujours l'action favorisante la plus marquée;

— La teneur du milieu en solvant organique gouverne la cinétique de la réaction, puisque la densité optique de 0,250 est obtenue en vingt et une minutes pour une concentration de 75 p. 100 en alcool butylique tertiaire, tandis que cette même valeur n'est atteinte qu'en cent vingt-six minutes pour une concentration de 60 p. 100;

— Il n'y a pas de relation générale entre le poids moléculaire de l'alcool et son action favorisante : si l'éthanol s'avère plus actif que le méthanol, le cellosolve, au contraire, accélère moins la réaction que son homologue inférieur.

Malgré la modification du protocole initial par baisse de la teneur en alcool, de nombreux composés ne peuvent être étudiés dans ces conditions où l'obtention d'un mélange homogène est impossible. Aussi, avons-nous été amené à réaliser une troisième série d'expériences.

Expériences en milieu alcoolique 90 p. 100

Le déphasage observé avec certains alcools provient essentiellement des deux points suivants :

— Faible solubilité de l'eau dans les alcools supérieurs;

— Solubilité encore plus faible des sels minéraux du tampon en milieu organique.

L'adoption du nouveau protocole suivant :

Glycocolle	0,390625 µM/ml
Ninhydrine	0,78125 µM/ml

en solution dans un mélange alcool-eau (90 : 10), nous a permis d'étudier comparativement l'influence du méthanol (XIX), de l'éthanol (XX), de l'isopropanol (XXI), du *n*-butanol-1 (XXII), du *n*-butanol-2 (XXIII), de l'isobutanol (XXIV), du butanol tertiaire (XXV) et de son homologue supérieur l'alcool amylique tertiaire (XXVI). On remarquera l'absence de tout sel minéral dans le mélange; l'augmentation de la teneur en solvant organique, jointe à l'élimination des phosphates (voir plus loin, p. 146) nous ont obligé à diminuer les concentrations de ninhydrine et de glycocolle pour rester dans les limites de coloration compatibles avec l'appareillage utilisé.

TABLEAU VIII

Système ninhydrine-glycocolle.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence des alcools méthylique (XIX), éthylique (XX), isopropylique (XXI), *n*-butylique-1 (XXII), *n*-butylique-2 (XXIII), isobutylique (XXIV), butylique tertiaire (XXV) et amylique tertiaire (XXVI).

t minutes	XIX	XX	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI
15	0,012	0	0,062	0,017	0,064	0,017	0,107	0,044
30	0,012	0,003	0,131	0,029	0,118	0,028	0,186	0,085
45	0,012	0,006	0,198	0,040	0,164	0,040	0,268	0,121
60	0,013	0,009	0,254	0,051	0,206	0,050	0,332	0,154
75	0,013	0,014	0,300	0,064	0,236	0,061	0,403	0,174
90	0,013	0,021	0,340	0,074	0,263	0,071	0,468	0,200
105	0,013	0,030	0,372	0,093	0,288	0,082	0,538	0,220
120	0,013	0,036	0,405	0,098	0,305	0,092	0,593	0,238
135	0,014	0,046	0,433	0,111	0,320	0,100	»	0,255
150	0,014	0,061	0,465	0,121	0,340	0,110	»	0,282
165	0,014	0,075	0,488	0,128	0,352	0,120	»	0,308
180	0,014	0,090	0,514	0,139	0,365	0,127	»	0,338

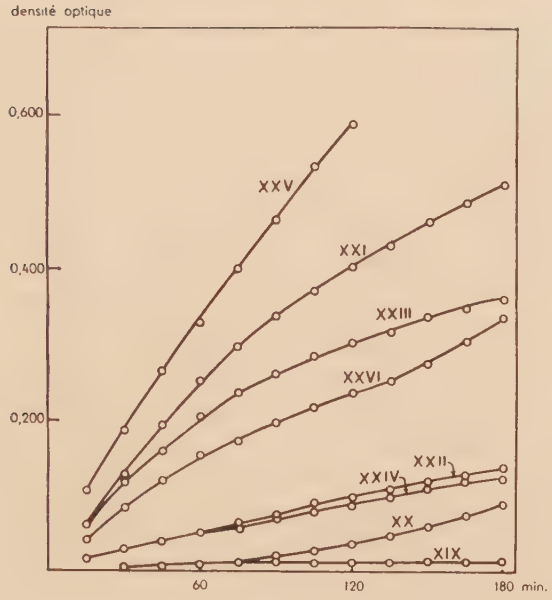


Fig. 12.

Système ninhydrine-glycocolle.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence des alcools méthylique (XIX), éthylique (XX), isopropylique (XXI), *n*-butylique-1 (XXII), *n*-butylique-2 (XXIII), isobutylique (XXIV), butylique tertiaire (XXV) et amylique tertiaire (XXVI).

Ces expériences appellent un certain nombre de remarques :

— Parmi les alcools primaires à chaîne linéaire étudiés, la séquence méthanol < éthanol < *n*-butanol-1 montre nettement l'influence favorisante d'une chaîne carbonée de condensation plus élevée;

— Cette règle ne peut s'appliquer aux alcools secondaires puisque l'on note pour les deux exemples choisis : isopropanol > *n*-butanol-2, pas plus qu'aux alcools tertiaires puisque l'alcool butylique tertiaire favorise davantage la production du colorant que l'alcool amylique tertiaire;

— Les alcools primaires sont moins efficaces sur le phénomène étudié que les alcools secondaires et tertiaires; ceci est particulièrement démontré par la comparaison des quatre alcools butyliques;

— L'augmentation de la concentration de la DYDA en fonc-

tion du temps n'obéit pas aux mêmes lois en présence des différents alcools, puisque le méthanol, le *n*-butanol-1, l'isobutanol et l'alcool butylique tertiaire fournissent pratiquement des droites sur le graphique, l'éthanol une courbe à concavité supérieure (comme celles observées précédemment en phase uniquement aqueuse), l'isopropanol, le *n*-butanol-2 et l'alcool amylique tertiaire des courbes à concavité inférieure; l'allure de ces dernières courbes plaide en faveur d'une décomposition partielle de la DYDA formée dans ces milieux.

Malgré les modifications successives de notre protocole initial, nous n'avons jamais pu obtenir de mélange homogène avec l'alcool isoamylique, le méthyl-3-pentyn-1-ol-3 et des alcools aromatiques comme l'alcool benzylique et l'alcool phényléthylique; des essais qualitatifs nous ont cependant montré que ces alcools possèdent également une action favorisante, de même que l'éthylène glycol, le propanediol-1,2, le butylène glycol-2,3 et le butanediol-1,3, la viscosité de ces quatre derniers solvants ne permettant pas le pipettage précis nécessaire pour nos expériences.

Le méthyl-2-propanol-2, quel que soit le protocole utilisé, s'étant montré l'alcool qui modifie le plus la cinétique de formation du pourpre de Ruhemann, nous en avons effectué une étude plus détaillée.

III. — ÉTUDE PARTICULIÈRE DE L'INFLUENCE DE L'ALCOOL BUTYLIQUE TERTIAIRE

Notre exposé est centré sur les points suivants :

— Etude des paramètres influençant le développement de la réaction chromatique en présence d'alcool butylique tertiaire;

— Discussion des résultats;

— Etude comparée de la réactivité avec la ninhydrine de divers aminoacides et de quelques substances apparentées.

A. — Etude des paramètres

Nous examinerons successivement l'influence :

— De la concentration en alcool,

— De la concentration en aminoacide,

— De la concentration en ninhydrine,

— De quelques sels minéraux.

1° *Rôle de la concentration en alcool*

A) *Essais avec le glycocolle en présence de phosphates.* — Nos premières expériences ont été réalisées avec le protocole de l'expérience III, la teneur en alcool étant fixée dans les divers essais à 25 p. 100 (XXVII), 50 p. 100 (XXVIII), 55 p. 100 (XXIX), 60 p. 100 (XXX), 65 p. 100 (XXXI), 70 p. 100 (XXXII) et à 75 p. 100 (XXXIII). Elles montrent que, dans ces conditions, seules les fortes concentrations en alcool butylique tertiaire favorisent l'apparition de la coloration.

TABLEAU IX

SYSTÈME NINHYDRINE-GLYCOCOLLE.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ALCOOL BUTYLIQUE TERTIAIRE.

t minutes	CONCENTRATION EN ALCOOL BUTYLIQUE TERTIAIRE, p. 100 (V/V)						
	25	50	55	60	65	70	75
	XXVII	XXVIII	XXIX	XXX	XXXI	XXXII	XXXIII
15	0	0,001	0,009	0,015	0,030	0,073	0,144
30	0	0,013	0,027	0,040	0,070	0,148	0,280
45	0,001	0,024	0,045	0,066	0,109	0,218	0,416
60	0,003	0,035	0,060	0,092	0,147	0,290	0,550
75	0,004	0,045	0,078	0,117	0,186	0,360	0,675
90	0,005	0,057	0,095	0,143	0,225	0,430	»
105	0,008	0,069	0,112	0,168	0,265	0,497	»
120	0,010	0,080	0,130	0,195	0,303	0,562	»
135	0,012	0,093	0,146	0,218	0,340	0,625	»
150	0,015	0,103	0,163	0,242	0,375	»	»
165	0,017	0,115	0,180	0,268	0,405	»	»
180	0,018	0,127	0,197	0,292	0,450	»	»

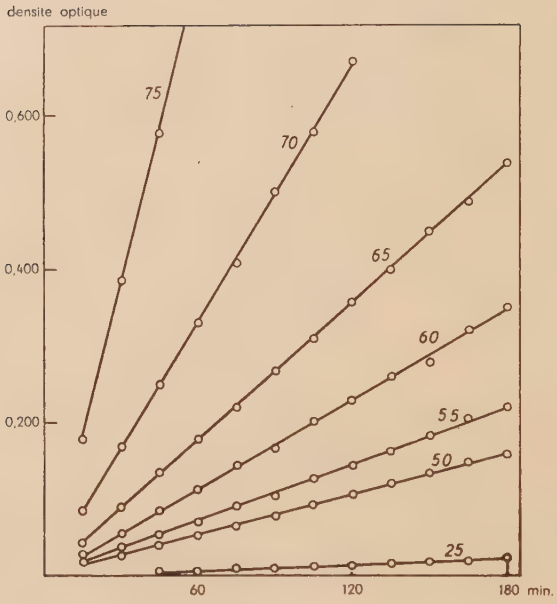


Fig. 13.

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

Remarquons la traduction graphique par des droites des cinétiques observées : en milieu butanolique tertiaire, la vitesse de formation de la DYDA ne se modifie donc pas en fonction du temps. Nous pouvons pénétrer plus intimement l'influence de la concentration en traçant la courbe de la densité optique, obtenue après soixante minutes, en fonction de la teneur en alcool; nous voyons sur la figure 14 qu'il s'agit vraisemblablement d'une courbe exponentielle, ce que confirme la courbe des variations du logarithme de la densité optique (après soixante minutes), en fonction de la concentration en alcool butylique tertiaire.

Compte tenu de nos erreurs expérimentales, et dans la limite des concentrations 25-75 p. 100 en méthyl-2-propanol-2, la densité optique d semble liée à la teneur en alcool c par une relation du type :

$$d = K\, e^{f(c)}$$

ou encore :

$$\log d = ac + b.$$

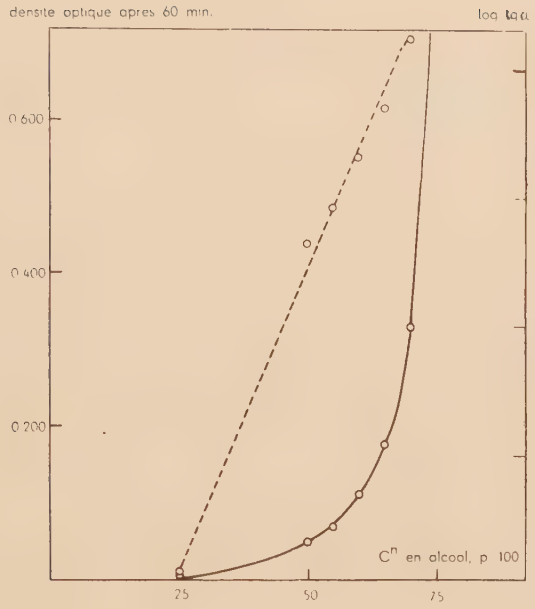


Fig. 14.

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.
En trait plein : densité optique après soixante minutes.
En pointillé : log tg α.

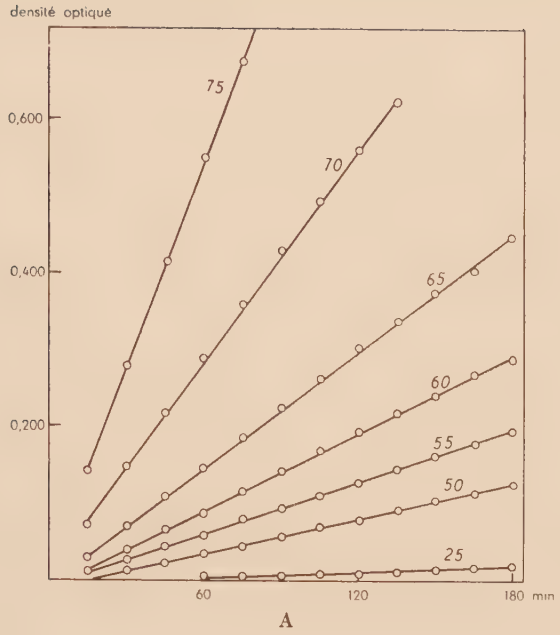
b) *Essais avec la DL-alanine en présence de phosphates.* — Le glycocolle, que nous avons choisi pour l'étude du rôle de la concentration en alcool, présente une position spéciale parmi les α-aminoacides, puisque c'est le seul composé dont le carbone en α est porteur de deux atomes d'hydrogène; aussi avons-nous effectué un essai analogue avec l'alanine. En raison de la réactivité plus faible de ce dernier aminoacide (voir p. 115), nous avons dû employer des concentrations en réactifs plus importantes (IV a, p. 114). Comme pour le glycocolle, les concentrations en alcool butylique tertiaire examinées sont de 25 p. 100 (XXXIV), 50 p. 100 (XXXV), 55 p. 100 (XXXVI), 60 p. 100 (XXXVII), 65 p. 100 (XXXVIII), 70 p. 100 (XXXIX) et 75 p. 100 (XL).

TABLEAU X

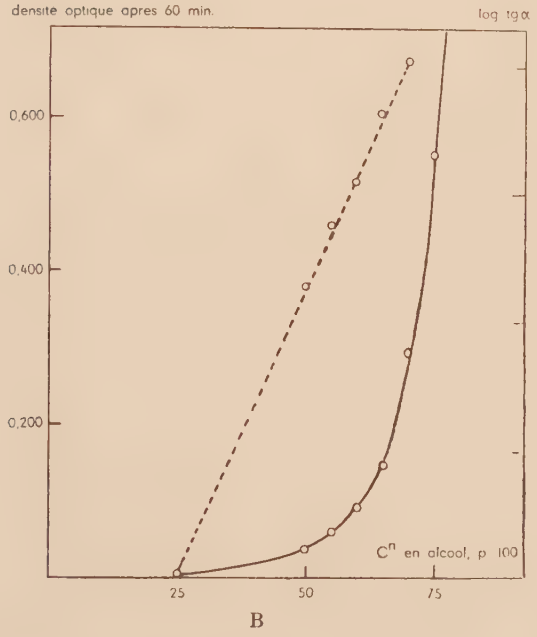
Système ninhydrine—DL-alanine.
Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

t minutes	Concentration en alcool butylique tertiaire, p. 100 (V/V)						
	25	50	55	60	65	70	75
	XXXIV	XXXV	XXXVI	XXXVII	XXXVIII	XXXIX	XL
15	0,000	0,016	0,020	0,027	0,045	0,085	0,180
30	0,001	0,026	0,037	0,055	0,089	0,167	0,386
45	0,003	0,040	0,054	0,085	0,134	0,249	0,580
60	0,005	0,052	0,071	0,113	0,178	0,332	0,778
75	0,010	0,065	0,091	0,144	0,220	0,408	»
90	0,010	0,078	0,103	0,166	0,266	0,500	»
105	0,014	0,094	0,127	0,202	0,310	0,580	»
120	0,014	0,107	0,145	0,230	0,358	0,670	»
135	0,016	0,119	0,164	0,262	0,400	»	»
150	0,018	0,134	0,184	0,281	0,450	»	»
165	0,020	0,148	0,208	0,322	0,490	»	»
180	0,023	0,160	0,220	0,350	0,538	»	»

On remarquera, en comparant les deux graphiques de la figure 15 avec ceux des figures 13 et 14, la grande similitude des résultats obtenus avec le glycocolle et l'alanine.



A



B

FIG. 15.

Système ninhydrine—DL-alanine.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

A. — Résultats expérimentaux.

B. — En trait plein : densité optique après soixante minutes.
En pointillé : log tgα.

c) *Essais avec le glycocolle sans phosphates.* — Afin d'étudier l'influence de l'alcool butylique tertiaire dans une plus large gamme de concentrations, nous avons effectué de nouvelles expériences en modifiant notre protocole :

— Les phosphates précipitent lorsque la teneur en alcool est importante, aussi les avons-nous supprimés de nos essais;

— De plus, nous avons utilisé des concentrations en acide aminé et en ninhydrine convenablement choisies pour donner naissance à une quantité de pourpre de Ruhemann mesurable dans nos conditions opératoires;

— En raison de l'analogie de comportement entre l'alanine et le glycocolle, seul ce dernier acide aminé a été examiné.

a) Une première série d'essais a été réalisée avec des solutions de ninhydrine (6,25 μM/ml) et de glycocolle (3,125 μM/ml) dans l'eau (XLI) et dans le méthyl-2-propanol-2 à 5 p. 100 (XLII), 10 p. 100 (XLIII), 15 p. 100 (XLIV), 20 p. 100 (XLV), 25 p. 100 (XLVI), 30 p. 100 (XLVII), 35 p. 100 (XLVIII), 40 p. 100 (XLIX), 45 p. 100 (L), 50 p. 100 (LI), 55 p. 100 (LII) et 60 p. 100 (LIII).

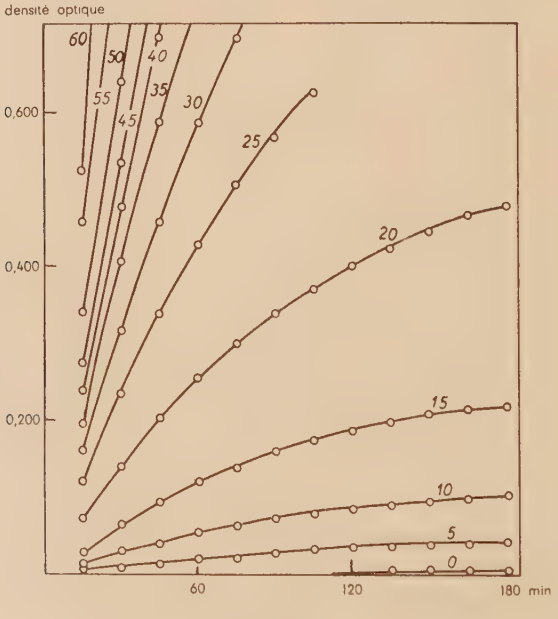


Fig. 16.

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

TABLEAU XI

Système ninhydrine-glycocolle.
Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

t minutes	Concentration en alcool butylique tertiaire, p. 100 (V/V)												
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
	XLI	XLII	XLIII	XLIV	XLV	XLVI	XLVII	XLVIII	XLIX	L	LI	LII	LIII
15	0	0,004	0,012	0,031	0,074	0,120	0,160	0,196	0,241	0,275	0,342	0,458	0,525
30	0	0,008	0,029	0,066	0,140	0.236	0,316	0,408	0,478	0,535	0,642	0,830	0,950
45	0	0,015	0,042	0,097	0,204	0,340	0,460	0,590	0,700	0,780	»	»	»
60	0	0,020	0,055	0,121	0,256	0,430	0,588	0,745	»	»	»	»	»
75	0	0,025	0,064	0,141	0,300	0,508	0,700	»	»	»	»	»	»
90	0,001	0,028	0,074	0.160	0,339	0,570	»	»	»	»	»	»	»
105	0,002	0,033	0,081	0,175	0,372	0,630	»	»	»	»	»	»	»
120	0,002	0,034	0,086	0,186	0,402	»	»	»	»	»	»	»	»
135	0,003	0,037	0,092	0,198	0,425	»	»	»	»	»	»	»	»
150	0,003	0,041	0,096	0.208	0,446	»	»	»	»	»	»	»	»
165	0,004	0,041	0,098	0,215	0,468	»	»	»	»	»	»	»	»
180	0,004	0,043	0,103	0,220	0,482	»	»	»	»	»	»	»	»

SYSTÈME

INFLUENCE DE LA CONCE

t minutes	CONCENTRATION EN ALCOO							
	0	5	10	15	20	25	30	
	LIV	LV	LVI	LVII	LVIII	LIX	LX	
15	0	0	0	0,005	0,007	0,018	0,025	
30	0	0	0,003	0,010	0,020	0,040	0,056	
45	0	0	0,005	0,015	0,030	0,060	0,087	
60	0	0	0,007	0,020	0,038	0,082	0,118	
75	0	0	0,008	0,024	0,047	0,100	0,146	
90	0	0	0,009	0,027	0,052	0,119	0,176	
105	0	0,001	0,011	0,031	0,060	0,136	0,202	
120	0	0,001	0,013	0,035	0,068	0,153	0,232	
135	0	0,001	0,013	0,041	0,074	0,168	0,256	
150	0	0,002	0,014	0,044	0,080	0,184	0,280	
165	0	0,002	0,014	0,049	0,084	0,196	0,304	
180	0	0,002	0,015	0,049	0,089	0,210	0,324	

ʏCOCOLLE.

OL BUTYLIQUE TERTIAIRE.

TERTIAIRE, p. 100 (V/V)

	45	50	55	60	65	70	75	80
I	LXIII	LXIV	LXV	LXVI	LXVII	LXVIII	LXIX	LXX
5	0,062	0,080	0,108	0,135	0,172	0,230	0,316	0,490
0	0,118	0,152	0,198	0,260	0,325	0,420	0,565	0,840
4	0,174	0,222	0,290	0,378	0,460	0,595	0,794	»
0	0,226	0,295	0,380	0,490	0,590	»	»	»
5	0,282	0,368	0,465	0,600	0,710	»	»	»
0	0,339	0,435	0,548	»	»	»	»	»
0	0,390	0,498	0,623	»	»	»	»	»
5	0,442	0,562	0,700	»	»	»	»	»
2	0,491	0,620	»	»	»	»	»	»
0	0,540	0,680	»	»	»	»	»	»
0	0,590	0,740	»	»	»	»	»	»
1	0,630	»	»	»	»	»	»	»

Nos résultats sont consignés sur le tableau XI et la figure 16. En l'absence de tout sel minéral, la production de pourpre de Ruhemann est donc également favorisée par l'augmentation de la concentration en alcool; mais les résultats ne sont toutefois pas strictement superposables à ceux obtenus en présence de phosphates, puisqu'on remarque que les courbes traduisant la cinétique du phénomène sont légèrement concaves vers le bas, alors que nous avons noté l'existence de droites sur la figure 13.

b) La deuxième série d'essais reprend les expériences de la p. 125, mais sans phosphates. Les concentrations en ninhydrine et en glycocolle ont été respectivement fixées, en effet, à 3,125 et à 1,5625 μM/ml, tandis que la teneur en butanol tertiaire est de 0 p. 100 (LIV), 5 p. 100 (LV), 10 p. 100 (LVI), 15 p. 100 (LVII); 20 p. 100 (LVIII), 25 p. 100 (LIX), 30 p. 100 (LX), 35 p. 100 (LXI), 40 p. 100 (LXII), 45 p. 100 (LXIII), 50 p. 100 (LXIV), 55 p. 100 (LXV), 60 p. 100 (LXVI), 65 p. 100 (LXVII), 70 p. 100 (LXVIII), 75 p. 100 (LXIX) et de 80 p. 100 (LXX).

Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau XII et sur les courbes de la figure 17; ces dernières apparaissent

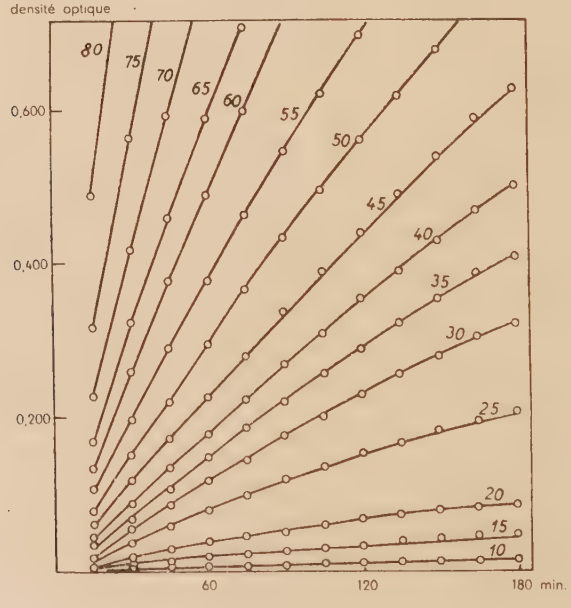


Fig. 17.

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

également concaves vers le bas, mais d'une manière moins marquée que celles illustrant l'expérience précédente.

c) La troisième série d'essais effectués en vue de préciser l'influence de la concentration en butanol concerne des teneurs en butanol plus forte, ce qui nous a obligé à réduire les concentrations de réactifs aux valeurs suivantes :

Ninhydrine ..... 1,5625 μM/ml
Glycocolle ..... 0,78125 μM/ml.

Les concentrations suivantes en alcool ont été examinées : 35 p. 100 (LXXI), 40 p. 100 (LXXII), 45 p. 100 (LXXIII), 50 p. 100 (LXXIV), 55 p. 100 (LXXV), 60 p. 100 (LXXVI), 65 p. 100 (LXXVII), 70 p. 100 (LXXVIII), 75 p. 100 (LXXIX), 80 p. 100 (LXXX), 85 p. 100 (LXXXI) et 90 p. 100 (LXXXII).

Les résultats photométriques sont inclus dans le tableau XIII et sur les courbes de la figure 18.

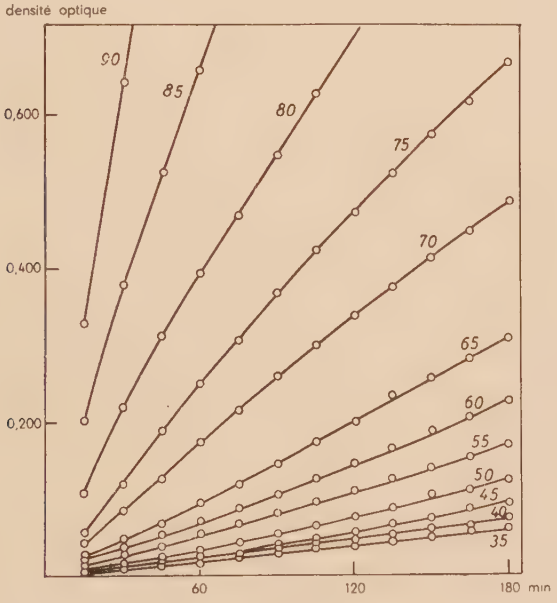


Fig. 18.

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

Il apparaît que les plus fortes concentrations en butanol tertiaire correspondent à un type de cinétique différent de celui observé avec des teneurs en alcool plus basses : en

TABLEAU XIII

Système ninhydrine-glycocolle.
Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

t minutes	Concentration en alcool butylique tertiaire, p. 100 (V/V)											
	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90
	LXXI	LXXII	LXXIIII	LXXIV	LXXV	LXXVI	LXXVII	LXXVIII	LXXIX	LXXX	LXXXI	LXXXII
15	0,003	0,003	0,005	0,006	0,017	0,021	0,026	0,043	0,056	0,110	0,204	0,331
30	0,007	0,008	0,011	0,016	0,030	0,036	0,050	0,085	0,122	0,221	0,380	0,642
45	0,013	0,013	0,017	0,025	0,042	0,053	0,068	0,128	0,188	0,312	0,525	»
60	0,018	0,018	0,024	0,034	0,055	0,070	0,095	0,174	0,250	0,392	0,660	»
75	0,022	0,024	0,032	0,045	0,068	0,088	0,120	0,218	0,310	0,470	0,810	»
90	0,026	0,032	0,040	0,055	0,081	0,106	0,146	0,260	0,368	0,550	»	»
105	0,034	0,038	0,048	0,066	0,096	0,127	0,175	0,300	0,423	0,630	»	»
120	0,038	0,044	0,057	0,077	0,110	0,146	0,200	0,340	0,475	»	»	»
135	0,043	0,052	0,066	0,089	0,125	0,167	0,234	0,378	0,525	»	»	»
150	0,050	0,059	0,075	0,104	0,142	0,189	0,258	0,415	0,575	»	»	»
165	0,058	0,064	0,086	0,111	0,155	0,206	0,284	0,450	0,622	»	»	»
180	0,060	0,074	0,094	0,125	0,172	0,228	0,312	0,488	0,672	»	»	»

effet, tandis que les courbes se rapportant aux concentrations supérieures à 70 p. 100 se montrent légèrement concaves vers le bas, celles qui traduisent au contraire les résultats obtenus pour des concentrations inférieures présentent une concavité inverse.

d) La dernière série d'essais nous a permis d'atteindre la concentration de 95 p. 100 en alcool butylique tertiaire, en réduisant encore de moitié les concentrations en réactifs par rapport à l'expérience précédente, puisque les valeurs suivantes ont été employées :

Ninhydrine ..... 0,78125 μM/ml
Glycocolle ..... 0,390625 μM/ml

dans le méthyl-2-propanol-2 à 50 p. 100 (LXXXIII), 75 p. 100 (LXXXIV), 80 p. 100 (LXXXV), 85 p. 100 (LXXXVI), 90 p. 100 (LXXXVII) et 95 p. 100 (LXXXVIII).

Les résultats, groupés dans le tableau XIV, sont illustrés sur la figure 19 par des droites.

TABLEAU XIV

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

t minutes	Concentration en alcool butylique tertiaire, p. 100 (V/V)					
	50	75	80	85	90	95
	LXXXIII	LXXXIV	LXXXV	LXXXVI	LXXXVII	LXXXVIII
15	0,012	0,018	0,022	0,050	0,103	0,198
30	0,013	0,028	0,042	0,092	0,180	0,408
45	0,014	0,036	0,064	0,132	0,255	0,650
60	0,015	0,045	0,083	0,168	0,312	»
75	0,015	0,055	0,104	0,198	0,377	»
90	0,017	0,065	0,122	0,227	0,440	»
105	0,018	0,074	0,140	0,255	0,503	»
120	0,019	0,090	0,168	0,282	0,575	»
135	0,019	0,095	0,177	0,322	»	»
150	0,019	0,104	0,196	0,360	»	»
165	0,021	0,115	0,212	0,394	»	»
180	0,021	0,125	0,230	0,427	»	»

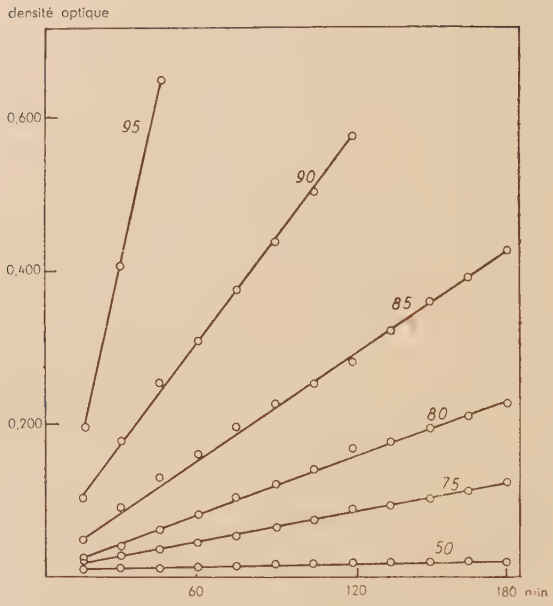


Fig. 19.

Système ninhydrine-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

e) Nous pouvons maintenant essayer de prendre une vue d'ensemble de l'influence de la concentration en alcool butylique tertiaire, en nous limitant aux expériences effectuées en l'absence de phosphates.

Pour comparer entre elles nos diverses expériences, nous avons représenté sur la figure 20 les valeurs de la densité optique enregistrées après soixante minutes en présence de concentrations variables en alcool, ceci avec les quatre protocoles étudiés dans les quatre paragraphes précédents.

On remarque, comme plus haut, qu'il n'existe pas de relation linéaire entre la concentration en alcool butylique tertiaire et la vitesse de formation du pourpre de Ruhemann.

La figure 21, sur laquelle nous avons indiqué les variations du logarithme des pentes des tracés de cinétique (en admettant que dans tous les cas examinés le tracé relatif aux soixante premières minutes puisse être assimilé à une droite), nous apporte une autre représentation de ce phénomène.

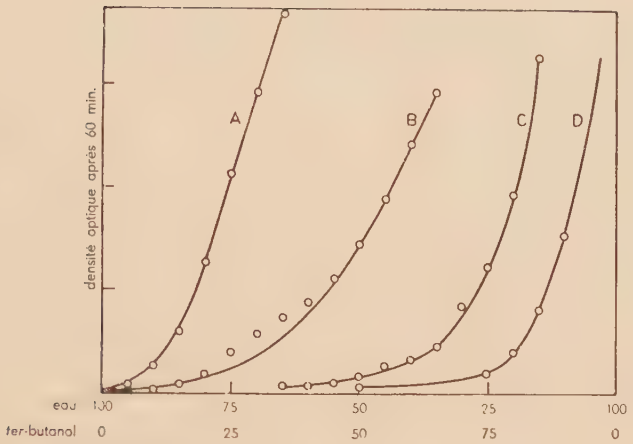


FIG. 20.

Système ninhydrine-glycocolle.

Valeur de la densité optique (après soixante minutes) en fonction de la teneur en alcool butylique tertiaire.

	Ninhydrine (μM/ml)	Glycocolle (μM/ml)
A	6,25	3,125
B	3,125	1,5625
C	1,5625	0,78125
D	0,78125	0,390625

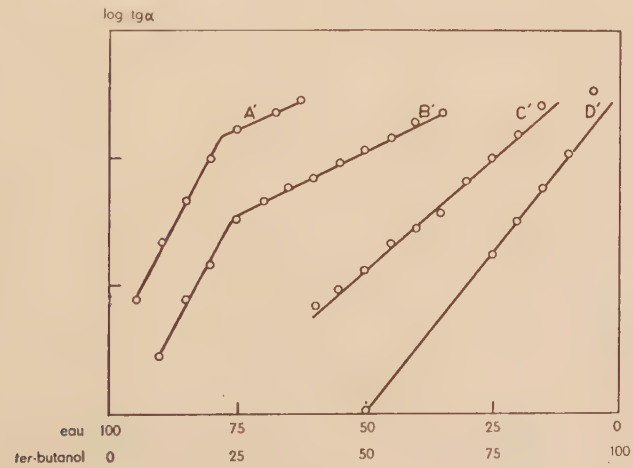


FIG. 21.

Système ninhydrine-glycocolle.

Valeur de log tg α (après soixante minutes) en fonction de la teneur en alcool butylique tertiaire. (A', B', C' et D' correspondent aux courbes A, B, C et D de la figure 20.)

Dans toute la gamme des concentrations en butanol tertiaire, l'alcool favorise la production de la DYDA, mais la cinétique de développement du pourpre de Ruhemann n'est pas partout la même :

— Pour des teneurs en alcool supérieures à 25 p. 100 (environ), l'expression $d = K\,e^{f(c)}$, à laquelle nous avons abouti précédemment (voir p. 126), semble vérifiée;

— Au contraire, pour des teneurs plus basses, donc en milieu fortement aqueux, le phénomène est plus complexe.

Remarquons enfin que les résultats obtenus précédemment en présence de phosphates rentrent dans le cadre que nous venons de tracer, puisqu'ils ont été enregistrés dans la limite des concentrations 25-75 p. 100 en alcool butylique tertiaire.

2° *Rôle de la concentration en aminoacide*

Pour effectuer ces expériences, nous avons choisi pour acide aminé l'alanine, en raison de sa réactivité « moyenne » avec

TABLEAU XV

Système ninhydrine—DL-alanine.

Influence de la concentration en acide aminé.

t minutes	Concentration en DL-alanine, µM/ml				
	0,39	0,78	1.56	3,12	6,25
	LXXXIX	XC	XCI	XCII	XCIII
15	0,006	0,016	0,033	0,064	0,137
30	0,010	0,028	0,064	0,125	0,276
45	0,014	0,040	0,092	0,188	0,420
60	0,018	0,052	0,120	0,251	0,555
75	0,024	0,065	0,150	0,317	0,695
90	0,028	0,076	0,176	0,373	»
105	0,032	0,088	0,205	0,445	»
120	0,038	0,100	0,233	0,510	»
135	0,040	0,112	0,261	0,575	»
150	0,045	0,125	0,292	0,632	»
165	0,050	0,137	0,320	»	»
180	0,058	0,150	0,348	»	»

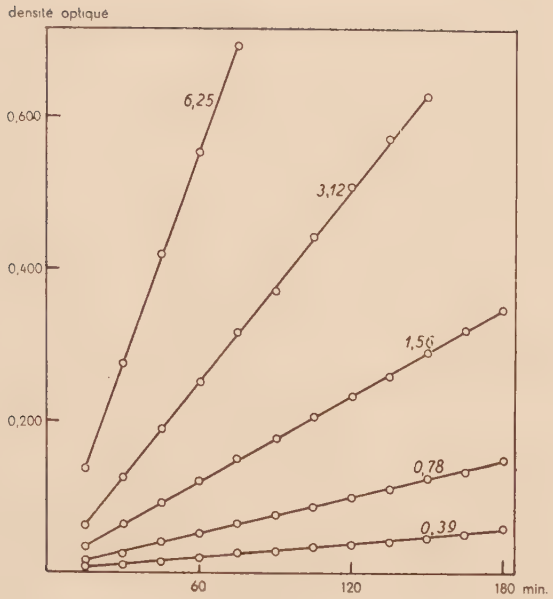


FIG. 22 A.

Système ninhydrine—DL-alanine.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence de quantités variables de DL-alanine (μM/ml).

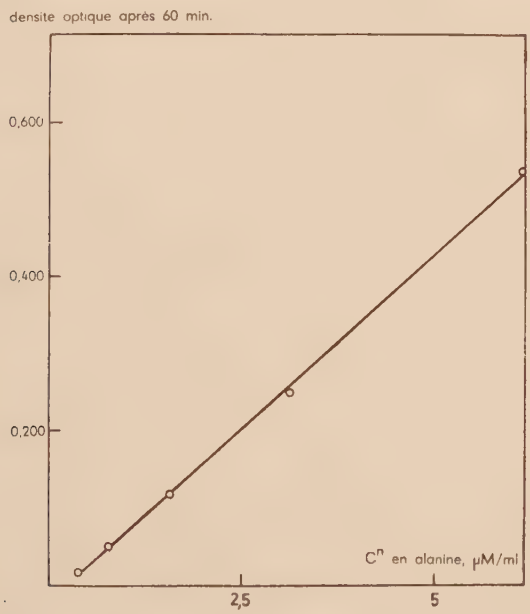


FIG. 22 B.

Système ninhydrine—DL-alanine.

Variation de la densité optique en fonction de la concentration en DL-alanine.

la ninhydrine (voir plus loin, p. 164). En maintenant la teneur globale en alcool butylique tertiaire à 75 p. 100, la concentration en ninhydrine à 3,125 μM/ml, celle en phosphate disodique comme celle en phosphate monopotassique à M/120, nous avons fait varier la concentration en aminoacide, réalisant les concentrations de 0,39 μM/ml (LXXXIX), 0,78 μM/ml (XC), 1,56 μM/ml (XCI), 3,12 μM/ml (XCII) et enfin 6,25 μM/ml (XCIII).

Ces essais (voir tableau XV et figure 22) nous montrent que, dans nos conditions opératoires, la vitesse de formation de la DYDA, constante dans le temps, est directement proportionnelle à la concentration en aminoacide.

3° *Rôle de la concentration en ninhydrine*

En maintenant fixes les paramètres :

— Concentration en alcool butylique tertiaire. 75 p. 100
— Concentration en alanine ..... 1,5625 μM/ml
— Concentration en PO_4H_2K M/120
— Concentration en PO_4HNa_2 ..... M/120

nous avons examiné le comportement de mélanges renfermant des quantités croissantes de ninhydrine : 0,781 μM/ml (XCIV), 1,5625 μM/ml (XCV), 3,125 μM/ml (XCVI), 6,25 μM/ml (XCVII) et 12,5 μM/ml (XCVIII).

Si la vitesse de formation de la DYDA apparaît bien constante en fonction du temps dans ces quelques essais, l'influence de la concentration en ninhydrine sur la vitesse de formation du pourpre de Ruhemann montre une relation plus complexe que celle observée dans le précédent paragraphe : la courbe représentative (courbe B, figure 23) apparaît légèrement concave vers le haut.

TABLEAU XVI

Système ninhydrine—DL-alanine.

Influence de la concentration en ninhydrine.

t minutes	Concentration en ninhydrine, µM/ml				
	0,781	1,5625	3,125	6,25	12,5
	XCIV	XCV	XCVI	XCVII	XCVIII
15	0,005	0,024	0,035	0,079	0,180
30	0,010	0,035	0,065	0,153	0,360
45	0,015	0,045	0,094	0,225	0,538
60	0,018	0,053	0,122	0,297	0,710
75	0,023	0,063	0,150	0,378	»
90	0,025	0,072	0,178	0,440	»
105	0,029	0,080	0,208	0,510	»
120	0,033	0,091	0,237	0,580	»
135	0,036	0,097	0,262	0,650	»
150	0,039	0,108	0,290	»	»
165	0,042	0,118	0,320	»	»
180	0,045	0,124	0,345	»	»

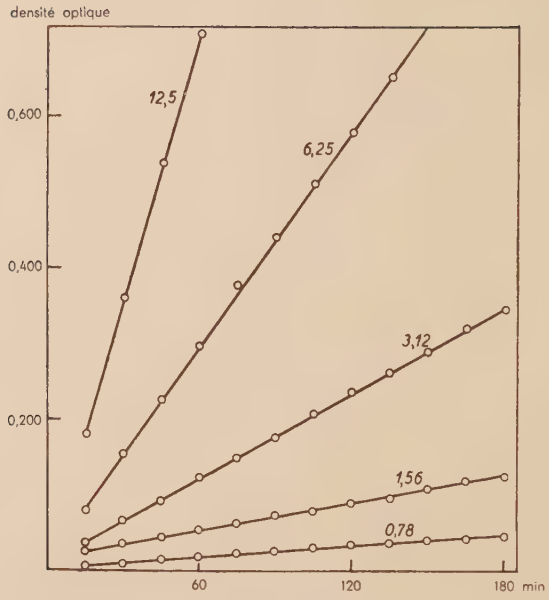


FIG. 23 A.

Système ninhydrine—DL-alanine.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en présence de quantités variables de ninhydrine (μM/ml).

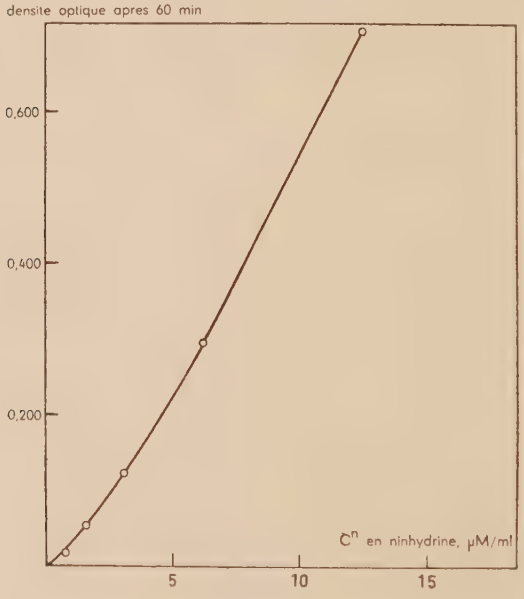


FIG. 23 B.

Système ninhydrine—DL-alanine.

Variation de la densité optique en fonction de la concentration en ninhydrine.

4° *Influence de quelques sels minéraux*

Dans un certain nombre d'expériences précédentes, nous avons introduit dans le milieu réactionnel de petites quantités de phosphates disodique et monopotassique en vue de maintenir constante la concentration en ions hydrogène. Les expériences ci-dessous nous montrent que ces sels, de même que le chlorure de sodium à plus forte concentration, manifestent un léger effet inhibiteur sur le développement de la coloration bleue. L'emploi des phosphates sera cependant utile lorsque nous effectuerons des comparaisons entre différents aminoacides.

Les essais que nous rapportons ont été réalisés en présence de :

Alcool butylique tertiaire	75 p. 100
DL-alanine	1,5625 μM/ml
Ninhydrine	3,125 μM/ml

sans sel minéral (XCIX), en présence de PO_4HNa_2 M/120 et de PO_4H_2K M/120 (C) ou enfin en présence de ClNa 62 μM/ml (CI).

TABLEAU XVII

Système ninhydrine—DL-alanine.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en l'absence de sel minéral (XCIX), en présence de PO_4HNa_2 M/120 et de PO_4H_2K M/120 (C) et en présence de ClNa 62 μM/ml (CI).

t minutes	XCIX	C	CI
15	0,060	0,036	0,038
30	0,116	0,061	0,073
45	0,174	0,087	0,104
60	0,231	0,115	0,140
75	0,280	0,142	0,173
90	0,335	0,170	0,208
105	0,385	0,200	0,240
120	0,430	0,225	0,275
135	0,475	0,254	0,310
150	0,520	0,285	0,345
165	0,560	0,312	0,377
180	0,605	0,342	0,412

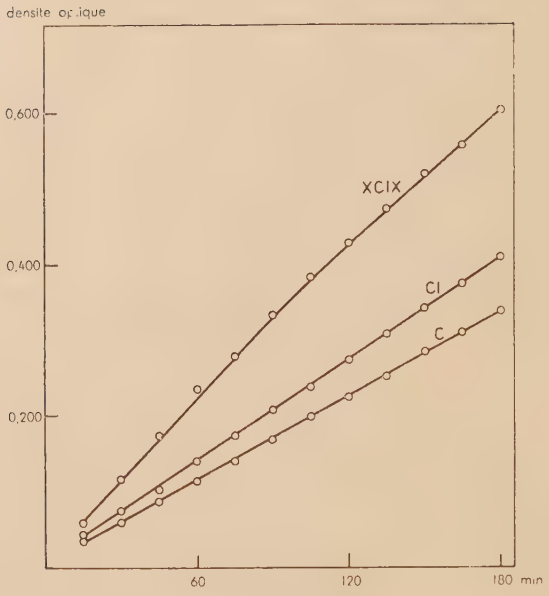


Fig. 24.

Système ninhydrine—DL-alanine.

Cinétique de l'apparition de la DYDA en l'absence de sel minéral (XCIX), en présence de PO_4HNa_2 M/120 et de PO_4H_2K M/120 (C) et en présence de ClNa 62 μM/ml (CI).

L'influence inhibitrice des phosphates peut être notée dans une large gamme de concentrations en alcool butylique tertiaire : il nous suffit de nous reporter aux expériences effectuées précédemment en présence de phosphates (XXVII à XXXIII, p. 125) ou en l'absence de tout sel minéral (LIV à LXX, p. 134). Nous avons reproduit sur la figure 25 les tracés correspondant à la densité optique mesurée dans les deux cas après soixante minutes : la même intensité de coloration nécessite une plus grande concentration en alcool butylique tertiaire lorsqu'on travaille en présence de phosphates. Toutefois, l'action inhibitrice des phosphates s'atténue légèrement quand la teneur en alcool augmente.

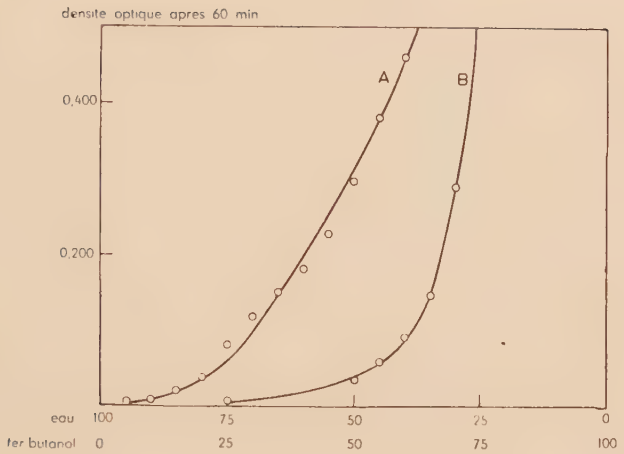


Fig. 25.

Système ninhydrine-glycocolle.

Densité optique après soixante minutes, obtenue en présence de phosphates (B) ou en l'absence de sel minéral (A).

En raison de la formation de complexes entre les amino-acides et certains cations, nous avons réalisé également quelques essais qualitatifs avec des sels de métaux divalents, avec le protocole ci-dessous :

Alcool butylique tertiaire	75 p. 100
Glycocolle	1,5625 μM/ml
Ninhydrine	3,125 μM/ml
Sel minéral d'un métal divalent.	0,78125 μM/ml.

Avec les sulfates de manganèse, de magnésium, de cobalt, de nickel, de zinc, de fer (Fe^{++}), de glucinium, avec les chlorures de calcium, de strontium et de baryum, on note l'apparition de la coloration normale (plus violacée toutefois avec les sels de nickel, de zinc et de baryum) ; nos résultats confirment donc les essais plus anciens de Halle et coll. [179]. Avec le sulfate de cadmium, la coloration est lilas, tandis qu'avec le sulfate de cuivre c'est une coloration jaune saumoné qui prend naissance; si l'on double la concentration en sel de cuivre, on n'observe aucune coloration dans les trois heures qui suivent la réalisation du mélange; ce dernier apparaît coloré en jaune le lendemain.

B. — Interprétation des résultats : le mode d'action des alcools dans la réaction ninhydrine-aminoacides

Comment interpréter l'action favorisante si intense de l'alcool butylique tertiaire et, d'une manière plus générale, celle des différents alcools que nous avons examinés ?

Trois points méritent tout d'abord d'être soulignés :

— L'action favorisante s'effectue avec tous les aminoacides naturels envisagés.

— L'action favorisante n'apparaît pas caractéristique d'un seul composé chimique, puisque de nombreux alcools donnent lieu à des réactions analogues. Bien plus, nous avons constaté qualitativement que d'autres solvants organiques non alcooliques, comme l'acétone, la méthyléthylcétone ou des alcools porteurs d'autres groupements, comme le diacétonealcool, favorisent également l'apparition de la coloration bleue.

— Les divers solvants organiques favorisent également d'autres réactions colorées des aminoacides : avec l'alloxanne, l'apparition de la murexide, pigment coloré en rouge (voir plus haut, p. 40), se produit à froid en présence de méthyl-2-propanol-2 pour des concentrations en alloxanne et en aminoacide qui ne donnent lieu à aucune coloration en l'absence de cet alcool; nous avons noté des résultats analogues, bien que moins nettement tranchés, avec l'isatine et le sel de sodium de l'acide β-naphtoquinone-sulfonique-4.

Pour illustrer ce dernier point, nous avons réalisé une brève étude quantitative dans le système alloxanne-glycocolle en utilisant le protocole suivant :

Alloxanne	12,5 μM/ml
Glycocolle	6,25 μM/ml
Phosphate monopotassique ...	M/120
Phosphate disodique	M/120
Butanol tertiaire	de 0 à 80 p. 100 (v/v).

La densité optique a été mesurée à $\lambda = 522$ mμ, valeur du maximum d'absorption de la murexide que nous avons déterminée expérimentalement.

Nos lectures sont groupées dans le tableau XVIII, pour les concentrations en alcool butylique tertiaire de 0 p. 100 (CII), 20 p. 100 (CIII), 30 p. 100 (CIV), 40 p. 100 (CV), 45 p. 100 (CVI), 50 p. 100 (CVII), 55 p. 100 (CVIII), 60 p. 100 (CIX), 65 p. 100 (CX), 70 p. 100 (CXI), 75 p. 100 (CXII) et de 80 p. 100 (CXIII).

TABLEAU XVIII

Système alloxanne-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

t minutes	Concentration en alcool butylique tertiaire, p. 100 (V/V)											
	0	20	30	40	45	50	55	60	65	70	75	80
	CII	CIII	CIV	CV	CVI	CVII	CVIII	CIX	CX	CXI	CXII	CXIII
15	0	0	0,003	0,007	0,019	0,021	0,027	0,033	0,041	0,072	0,111	0,221
30	0,003	0,006	0,010	0,020	0,035	0,043	0,058	0,082	0,115	0,212	0,360	0,720
45	0,004	0,012	0,020	0,035	0,054	0,068	0,097	0,142	0,209	0,370	0,650	»
60	0,004	0,017	0,030	0,052	0,074	0,097	0,138	0,203	0,304	0,560	»	»
75	0,005	0,024	0,040	0,068	0,095	0,126	0,177	0,268	0,380	0,740	»	»
90	0,005	0,030	0,050	0,085	0,115	0,154	0,215	0,331	0,470	»	»	»
105	0,006	0,034	0,060	0,098	0,133	0,176	0,250	0,393	0,552	»	»	»
120	0,006	0,040	0,069	0,113	0,150	0,200	0,294	0,450	0,613	»	»	»
135	0,006	0,045	0,077	0,125	0,167	0,225	0,318	0,510	0,680	»	»	»
150	0,006	0,048	0,084	0,136	0,182	0,240	0,345	0,558	0,745	»	»	»
165	0,006	0,050	0,090	0,150	0,196	0,260	0,376	0,608	»	»	»	»
180	0,007	0,053	0,096	0,156	0,209	0,274	0,396	0,645	»	»	»	»

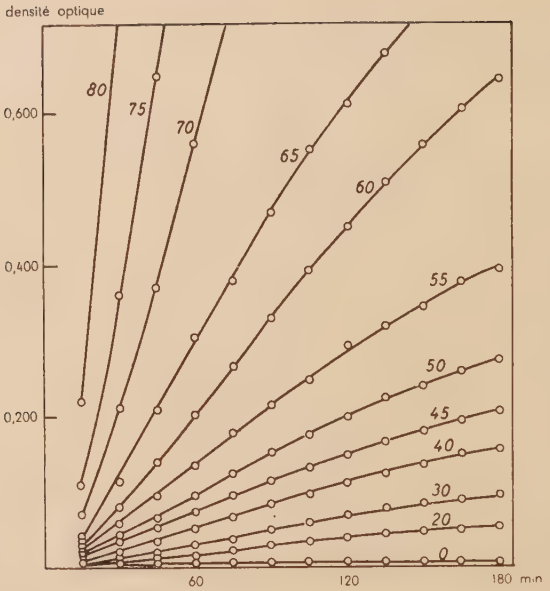


FIG. 26 A.

Système alloxanne-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

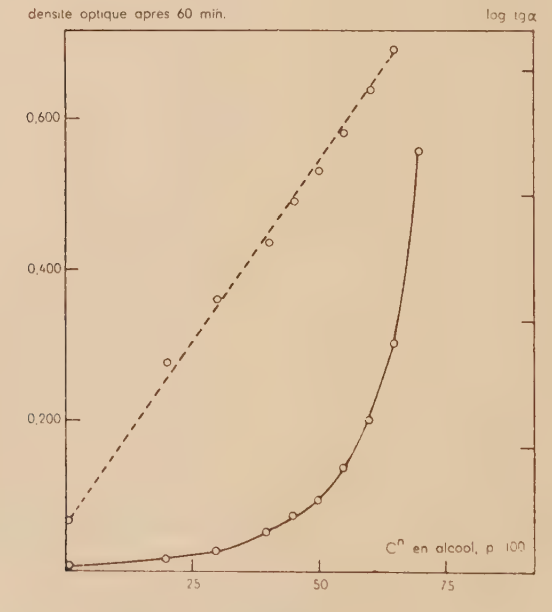


FIG. 26 B.

Système alloxanne-glycocolle.

Influence de la concentration en alcool butylique tertiaire.

En trait plein : densité optique après soixante minutes;
En pointillé : log tg α.

On notera que les concentrations en alloxanne et en aminoacide sont assez élevées par rapport à celles habituellement utilisées dans nos expériences avec la ninhydrine : la polycétone monocyclique apparaît donc moins réactive que le composé indanique. Sur les figures 26 A et 26 B, qui illustrent les résultats, on constate que les différents tracés sont très semblables à ceux obtenus avec la ninhydrine (fig. 13 et 14, pp. 126 et 127).

Nous avons pensé que la présence d'alcool modifiait l'état physique sous lequel se trouve l'aminoacide dans le milieu réactionnel. On sait, en effet, depuis les travaux de Vorländer [495], que certains aminoacides aromatiques perdent leur caractère amphotère en milieu alcoolique. Birckner [42 a] confirmait bientôt ces résultats pour les acides aminés naturels, qui se montrent acides vis-à-vis de la phénolphtaléine lorsqu'on les dissout en milieu riche en éthanol; le groupement carboxylique ne serait pas seul modifié dans sa réactivité, car Foreman [149], l'année suivante, montrait que le groupement aminé perd également son alcalinité en milieu organique. Ces constatations sont à la base de techniques de dosage titrimétrique des aminoacides en présence d'alcool [42 a, 149, 510, 195, 296, 287, 225], d'acétone [481] ou de dioxanne [122, 191, 192].

L'étude des constantes de dissociation des aminoacides en milieu hydro-organique, entre les mains de Michaelis et Mizutani [296], de Mizutani [299], de Jukes et Smith [225], permet de préciser le mécanisme d'action du solvant organique qui augmente le *p*K de la fonction acide et diminue le *p*K correspondant au groupement aminé, cette deuxième variation étant bien plus faible que la première.

N'ayant trouvé dans la littérature aucun renseignement sur le comportement des aminoacides dans l'alcool butylique tertiaire, nous avons été amené à effectuer des titrages électrométriques d'alanine en présence de 25 p. 100, de 50 p. 100 et de 75 p. 100 de méthyl-2-propanol-2.

Nos essais ont été réalisés avec l'appareil Titriskop Metrohm; nous avons noté la différence de potentiel entre une électrode de verre et une électrode au calomel, les résultats étant exprimés en mV en raison de la difficulté de définition du *p*H en milieu hydro-organique.

On remarquera sur les courbes de la figure 27 que si la présence d'alcool butylique tertiaire ne modifie guère la dissociation de la fonction amine, il n'en est pas de même de celle

du groupement carboxylique, surtout pour les deux concentrations les plus élevées en solvant organique.

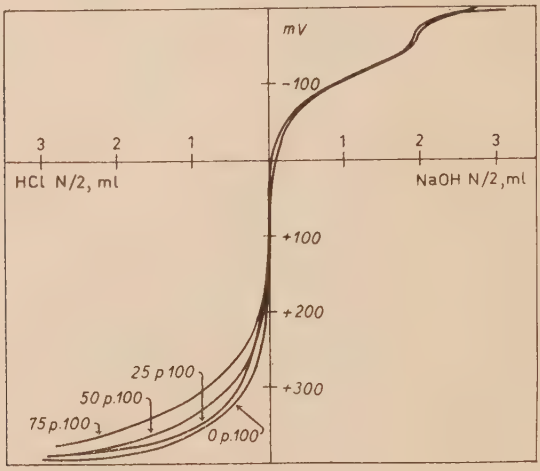


Fig. 27.

Courbes de titrage électrométrique de la DL-alanine dans l'eau et dans des mélanges eau-alcool butylique tertiaire. (1 mM d'acide aminé dans un volume total de 20 ml de solvant.)

Ces premiers résultats nous ont conduit à penser que l'alcool butylique tertiaire, en diminuant l'ionisation du groupement carboxylique de l'aminoacide, augmente la réactivité du groupement aminé, lui permettant ainsi d'agir plus rapidement sur la ninhydrine : nous avons vu, en effet, dans la première partie de notre travail (voir p. 47), que les théories les plus récentes sur le mode d'action de la ninhydrine admettent toutes la formation initiale d'une base de Schiff.

S'il en est bien ainsi, la modification qu'entraîne le butanol tertiaire sur les courbes d'électrotitration de l'aminoacide doit être bien plus marquée que celle apportée par l'éthanol, dont nous avons vu l'influence plus faible sur le développement de la coloration bleue.

Une nouvelle expérience nous a montré qu'il n'en est rien : nous avons étudié comparativement l'action de l'éthanol et du butanol tertiaire à la concentration de 60 p. 100 (*) et

(*) C'est la concentration maximum en éthanol ne donnant pas lieu à la précipitation de l'aminoacide.

constaté que le composé dicarboné augmentait davantage le *p*K du groupement carboxylique de l'aminoacide que le méthyl-2-propanol-2 (voir figure 28).

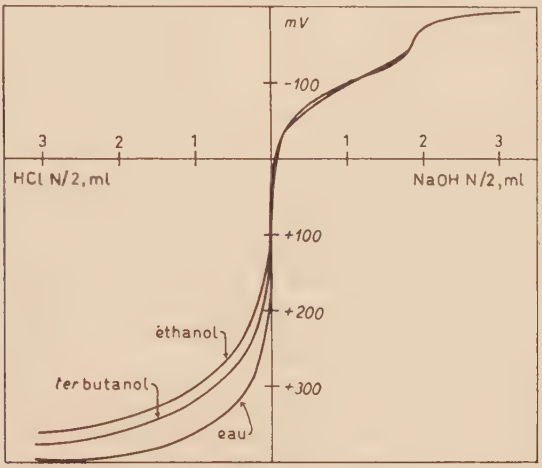
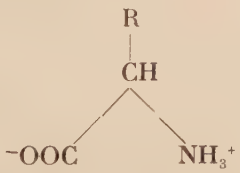


FIG. 28.

Courbes de titrage électrométrique de la DL-alanine dans l'eau, l'éthanol à 60 p. 100 et le butanol tertiaire à 60 p. 100. (1 mM d'acide aminé dans un volume total de 20 ml de solvant.)

Une expérience analogue, réalisée avec le glycocolle, nous a donné des résultats tout à fait superposables.

Les conceptions modernes relatives à l'ionisation des aminoacides (*) nous permettent d'interpréter une partie de nos résultats expérimentaux. A la suite des travaux de BJERRUM [43], de nombreux auteurs [296, 128, 42, 196, 502, 298 a, 130] ont démontré qu'en solution aqueuse l'acide aminé se trouve totalement ionisé sous la forme d'un ion amphotère appelé ion hybride, amphion ou plus souvent zwitterion :



Cet ion amphotère, en raison de sa double charge, possède un moment dipolaire important et se montre capable de

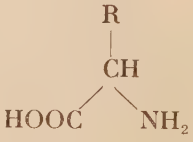
(*) Consulter à ce sujet les revues de MOREL [306] et d'ALBERTY [15].

s'entourer de nombreuses molécules d'eau, d'où sa solubilité en milieu aqueux. L'addition de soude ou d'acide détruit le zwitterion en donnant un anion ou un cation, selon les équations :

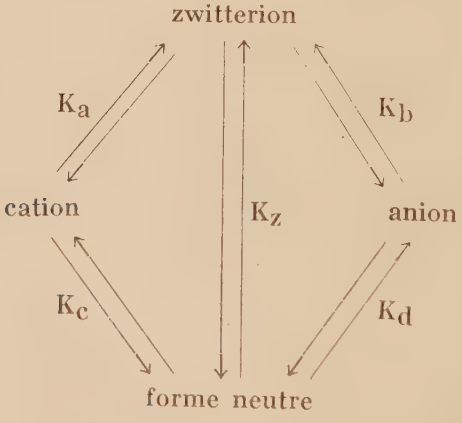
$$^{-}OOC - CH(R) - NH_3^{+} + OH^{-} \rightarrow H_2O + {}^{-}OOC - CH(R) - NH_2$$

$$^{-}OOC - CH(R) - NH_3^{+} + H^{+} \rightarrow HOOC - CH(R) - NH_3^{+}$$

En milieu organique, au contraire, comme l'ont bien montré Edsall et Blanchard [130], l'aminoacide existe en partie sous sa forme non ionique :



Cette forme, non chargée, n'est pas hydratée et peut ainsi se dissoudre dans le milieu organique. Ebert [128] a montré l'équilibre existant entre le zwitterion et la forme neutre, équilibre auquel correspond la constante Kz. On peut également arriver à la forme électriquement neutre à partir du cation ou de l'anion, comme l'illustre le schéma ci-dessous :



En solution aqueuse, le groupement aminé de l'aminoacide, nécessaire au « démarrage » de la réaction chromatique donnée par la ninhydrine, ne possède qu'une réactivité

minime, car deux facteurs inhibiteurs ajoutent leurs effets :

— La présence du groupement carboxylique, qui bloque sous la forme d'un sel interne le groupement basique;

— L'hydratation du zwitterion, qui gêne l'approche des molécules de ninhydrine.

En milieu organique, la double inhibition est levée : les charges disparaissent, leur disparition entraînant *ipso facto* le départ de la lyosphère, départ d'autant plus aisé que les molécules d'eau vont être captées et viennent s'unir par des liaisons hydrogène aux groupements hydrophiles du solvant organique. Le groupement amine reprend alors toutes ses possibilités réactionnelles. Cette hypothèse est encore étayée par un nouveau fait : dans nos expériences, l'action du solvant organique équivaut au chauffage du milieu réactionnel purement aqueux; or Edsall et Blanchard [130] ont montré que le chauffage d'une solution aqueuse d'aminoacide transforme partiellement le zwitterion en aminoacide non chargé.

Nous comprenons maintenant l'échec de nos électrotitrations : nos courbes nous ont simplement fourni des données sur les équilibres réglés par les constantes Ka et Kb, sans parvenir à nous renseigner sur l'équilibre zwitterion $\leftrightarrows$ forme neutre.

Pourquoi observe-t-on la décharge du zwitterion en milieu organique ? Pour répondre à cette question, il faut d'abord remarquer que si le zwitterion est stable en phase aqueuse, c'est en raison du pouvoir diélectrique très élevé de ce liquide ($\varepsilon = 80$) ; or les solvants organiques que nous avons étudiés possèdent une constante diélectrique bien plus faible (*) :

	t° C.	ε
Méthanol	25	32,63
Ethanol	25	24,30
n-Propanol	25	20,1
Isopropanol	25	18,3
n-Butanol-1	25	17,1
n-Butanol-2	25	15,8
Isobutanol	25	17,7
Butanol tertiaire	30	10,9
Alcool amylique tertiaire	25	5,82
Méthylcellosolve	30	16,0

(*) Ces constantes ont été extraites de l'ouvrage : « Technique of organic chemistry, vol. VII : Organic solvents, physical properties and methods of purification »; 1 vol., 552 p., Interscience publishers, édit., New York, 1955.

Ces constantes doivent être comparées à nos résultats expérimentaux (voir p. 116) ; si la constante diélectrique du milieu est un facteur déterminant, nous devons observer des séquences inversées. C'est bien le cas pour :

méthanol > éthanol > *n*-butanol-1

et pour :

n-butanol-1 > *n*-butanol-2 > butanol tertiaire.

Au contraire, l'alcool amylique tertiaire, malgré sa très faible constante diélectrique, apparaît moins actif que son homologue inférieur l'alcool butylique tertiaire.

Nous avons pu préciser, grâce à l'amabilité de MM. C. J. F. Böttcher, professeur à l'Université de Leyde, et de F. C. de Vos, chef de travaux dans cette même université, que nous tenons à remercier tout particulièrement, l'influence de la constante diélectrique sur l'apparition de la DYDA dans les expériences mettant en œuvre l'alcool butylique tertiaire; ces chercheurs néerlandais ont bien voulu, à la demande de M. Neuzil, déterminer les constantes diélectriques de divers mélanges eau-butanol tertiaire à la température de 21° C., température à laquelle nos expériences ont été effectuées. Les mesures ont été réalisées à une fréquence de 250 kc/s. La constante diélectrique du butanol tertiaire examiné à 21° C. n'est pas directement mesurable en raison de la solidification de l'alcool; par extrapolation, on obtient la valeur de $\varepsilon = 12{,}14$. Pour les mélanges eau-butanol tertiaire, les résultats ci-dessous ont été notés :

p. 100 butanol tertiaire (v/v)	$\varepsilon_{21°\,C.}$
94,84	12,76
90,03	14,45
84,98	17,35
80,00	20,70
73,16	25,60
69,82	28,00
66,65	30,40
65,00	31,20
60,13	35,80
55,00	40,00
49,93	44,40
24,38	65,50
0	79,65

La courbe traduisant les variations de ε en fonction de la teneur en alcool (fig. 29), apparaît donc approximativement linéaire, sauf toutefois à ses deux extrémités.

Fig. 29.

Constante diélectrique des mélanges eau-butanol tertiaire. (Courbe aimablement communiquée par MM. C. J. F. Böttcher et F. C. de Vos.)

En tenant compte de ces données, nous avons pu tracer, pour le système ninhydrine-glycocolle en solution dans divers mélanges eau-butanol tertiaire, les variations de log tg α en fonction de la constante diélectrique (fig. 30).

On remarque que la relation : $d = K\,ef(\varepsilon)$ n'est applicable qu'aux mélanges de faible constante diélectrique.

Si la transformation du zwitterion en aminoacide électriquement neutre semble être un facteur important de la réactivité en milieu organique, d'autres éléments semblent intervenir également, surtout lorsque la concentration en eau est importante (forte constante diélectrique du milieu). De plus,

nous avons remarqué que l'alcool butylique tertiaire favorise, à la température du laboratoire, l'apparition de la DYDA au cours de la réaction de la ninhydrine avec d'autres substances

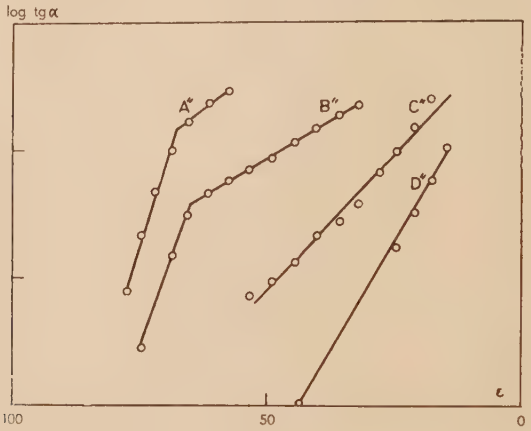


Fig. 30.

Système ninhydrine-glycocolle en présence d'alcool butylique tertiaire. Influence de la constante diélectrique sur la valeur de log tg α. A", B", C", D" : voir A', B', C', D', fig. 21, p. 139.

que les acides α-aminés et notamment avec diverses amines aliphatiques et aromatiques, à des concentrations en tricétone et en amine incapables de donner la moindre coloration en l'absence de cet alcool; or, pour ces amines, la notion de zwitterion ne peut être invoquée.

Nous comptons orienter nos recherches, dans un proche avenir, sur les modifications éventuelles que peut subir la ninhydrine lorsqu'on la dissout en milieu organique.

C. — Etude comparée de la réactivité des divers aminoacides et de quelques substances apparentées, avec la ninhydrine, en présence d'alcool butylique tertiaire

Quelques auteurs, au cours d'essais de transposition sur le plan analytique de la réaction ninhydrine-aminoacides, ont examiné l'influence du temps sur le développement de la coloration bleue [186, 41, 463, 504, 523] ou sur le dégagement du gaz carbonique [479] ou de l'ammoniac [102]; mais la

plupart d'entre eux, visant des buts pratiques, ont recherché le temps minimum de chauffage nécessaire à la complétion de la réaction et n'ont pas réalisé une véritable étude cinétique. L'étude de la cinétique à température élevée soulève d'ailleurs des objections de principe : un composé possédant un groupement amine secondaire, dont nous avons signalé plus haut l'absence de réactivité avec la ninhydrine (voir p. 56), risque dans ces conditions de se transformer en une amine primaire réactive. Quelques comparaisons entre différents aminoacides ont bien été effectuées par Abderhalden [12], mais cet auteur ne fournit que des résultats qualitatifs.

Nous avons voulu mettre à profit l'action favorisante de l'alcool butylique tertiaire pour effectuer, à la température du laboratoire, une comparaison de la cinétique fournie par l'action de divers aminoacides et de quelques substances apparentées avec la ninhydrine. Les produits utilisés, sauf mention particulière, proviennent de la firme « Biochimiques Roche » ; sauf quelques-uns d'entre eux que nous signalerons au passage, ils se sont montrés purs à l'examen chromatographique. Le protocole adopté, dont nous donnerons le détail ci-après, met en œuvre un tampon phosphate, une concentration de 75 p. 100 en alcool butylique tertiaire, des quantités de ninhydrine et d'aminoacide compatibles avec la sensibilité de notre spectrophotomètre et un temps d'observation de trois heures :

Concentration en alcool butylique tertiaire.	75 p. 100
Concentration en ninhydrine	3,125 μM/ml
Concentration en aminoacide (ou en substance apparentée)	1,5625 μM/ml
Concentration en PO_4H_2K	M/120
Concentration en PO_4HNa_2	M/120.

Nos résultats expérimentaux, groupés dans une série de tableaux (XIX à XXXI), ont été reportés en appendice pour faciliter leur consultation.

1° *Produits expérimentés*

Nous avons étudié 125 composés dont on trouvera la liste ci-dessous; les composés de caractère nettement acide ou basique ont été le plus souvent étudiés tels quels, puis sous la forme d'un sel, en raison de la faible concentration en tampon phosphate utilisé, concentration seule compatible avec des essais en milieu hydro-alcoolique; de nombreux essais ont

été répétés et ont montré la bonne reproductibilité des résultats notés.

	Expérience n°
Monoacides monoaminés aliphatiques simples	
— Acides α-aminés à chaîne linéaire.	
Glycocolle	*I*
DL-alanine	*II*
L-alanine	*II a*
D-alanine	*II b*
Ac. DL-α-aminobutyrique (*)	*III*
DL-norvaline	*IV*
DL-norleucine	*V*
— Acides α-aminés à chaîne ramifiée.	
DL-valine	*VI*
L-valine	*VI a*
D-valine	*VI b*
DL-leucine	*VII*
L-leucine	*VII a*
D-leucine	*VII b*
DL-isoleucine	*VIII*
L-isoleucine	*VIII a*
D-isoleucine	*VIII b*
— Acides β-aminés à chaîne linéaire.	
β-alanine	*IX*
Ac. DL-β-aminobutyrique (*)	*X*
— Acide γ-aminé à chaîne linéaire.	
Ac. DL-γ-aminobutyrique (*)	*XI*
Acides aminés à fonction alcool et dérivés	
DL-sérine	*XII*
DL-azasérine (**)	*XIII*
O-glycyl-DL-sérine, HCl (**)	*XIV*
O-glycyl-DL-sérine, base	*XIV a*
DL-homosérine (***)	*XV*
DL-thréonine	*XVI*
Acides aminés soufrés	
Ac. L-cystéique (****)	*XVII*
Ac. L-cystéique (sel de Na)	*XVII a*
Taurine	*XVIII*
Taurine (sel de Na)	*XVIII a*
DL-méthionine	*XIX*
DL-éthionine	*XX*

(*) Provient de chez Serlabo, 16, rue des Tournelles, Paris (IV^e^).

(**) Nous remercions la Direction scientifique des Laboratoires Parke, Davis and C°, Detroit 32, Michigan, U. S. A., et le docteur Augé d'avoir gracieusement fait parvenir ces échantillons à notre laboratoire.

(***) Ce produit nous a été aimablement fourni par le docteur Cohen, de l'Institut Pasteur, par l'intermédiaire du docteur Neuzil.

(****) Nous avons préparé ce produit d'après la technique décrite dans : Organic syntheses, 1940, **20**, 23-25; 1 vol., 113 p., John Wiley & Sons, édit., New York.

	Expérience n°
Diacides monoaminés et dérivé	
Ac. L-aspartique	*XXI*
Ac. L-glutamique	*XXII*
L-glutamine	*XXIII*
Diaminomonoacides	
L-ornithine, 2 HCl	*XXIV*
L-ornithine, HCl	*XXIV a*
L-ornithine, base	*XXIV b*
L-lysine, 2 HCl	*XXV*
L-lysine, HCl	*XXV a*
L-lysine, base	*XXV b*
L-citrulline	*XXVI*
L-arginine, HCl	*XXVII*
L-arginine, base	*XXVII a*
Diaminodiacides	
Ac. diaminopimélique (*)	*XXVIII*
Ac. diaminopimélique	*XXVIII a* (**)
Acides aminés benzéniques	
DL-phénylalanine	*XXIX*
DL-phénylalanine (sel de Na)	*XXIX a*
L-phénylalanine	*XXIX b*
D-phénylalanine	*XXIX c*
L-tyrosine (sel de Na)	*XXX*
L-dihydroxyphénylalanine	*XXXI*
Acides aminés hétérocycliques	
DL-histidine, HCl	*XXXII*
DL-histidine, base	*XXXII a*
L-histidine, HCl	*XXXII b*
D-histidine, HCl	*XXXII c*
L-tryptophanne (***)	*XXXIII*
Acides α-aminés-α-méthylés	
Ac. α-aminoisobutyrique (****)	*XXXIV*
Isovaline (****)	*XXXV*
α-méthylvaline (*****)	*XXXVI*
α-méthylsérine (*****)	*XXXVII*
α-méthylphénylalanine (*****)	*XXXVIII*
α-méthyltryptophanne (*****)	*XXXIX*

(*) L'acide diaminopimélique utilisé avait été aimablement envoyé au docteur Neuzil par le docteur E. M. Weber, directeur de recherches aux Laboratoires Chas, Pfizer & C°, Inc., 630 Flushing Avenue, Brooklyn 6, N. Y. (U. S. A.).

(**) En raison de la présence dans l'acide diaminopimélique de deux groupements acide α-aminé, l'expérience *XXVIII a* a été effectuée avec une concentration en acide diaminopimélique moitié de celle habituellement utilisée (donc de 0,78125 μM/ml).

(***) La chromatographie de ce produit nous a révélé, à côté d'un spot principal, de petites quantités d'impuretés donnant une faible réaction positive avec la ninhydrine.

(****) Nous devons ces acides aminés à l'obligeance de M. le professeur Cristol, de la Faculté de médecine de Montpellier.

(*****) Aimablement fournis à notre Laboratoire par le docteur W. W. Umbreit, des Laboratoires Merck, Rahway, N. J. (U. S. A.).

	Expérience n°
Peptides	
Glycylglycine	*XL*
Glycyl-DL-leucine	*XLI*
Glycyl-L-tyrosine	*XLII*
Glycyl-L-tryptophanne	*XLIII*
DL-alanylglycine	*XLIV*
DL-leucylglycine	*XLV*
L-leucylglycine	*XLV a*
D-leucylglycine	*XLV b*
DL-leucylglycylglycine	*XLVI*
L-leucyl-L-tyrosine	*XLVII*
Histidylhistidine	*XLVIII*
Alcool α-aminé	
Colamine, HCl	*XLIX*
Colamine, base	*XLIX a*
Aminoacides N-substitués	
Sarcosine	*L*
DL-acétylméthionine	*LI*
Monoamines dérivées des aminoacides	
Propylamine, base	*LII*
Propylamine, HCl	*LII a*
n-Butylamine, base	*LIII*
n-Butylamine, HCl	*LIII a*
Isobutylamine, base	*LIV*
Isobutylamine, HCl	*LIV a*
Tyramine, base	*LV*
Tyramine, HCl	*LV a*
Histamine, base	*LVI*
Histamine, HCl	*LVI a*
Tryptamine, base	*LVII*
Tryptamine, HCl	*LVII a*
Diamines dérivées des aminoacides	
Cystamine, 2 HCl (*)	*LVIII*
Cystamine, base	*LVIII a*
Putrescine, 2 HCl	*LIX*
Putrescine, base	*LIX a*
Cadavérine, 2 HCl	*LX*
Cadavérine, base	*LX a*
Agmatine, SO_4H_2	*LXI*
Agmatine, base	*LXI a*
Amines diverses	
D-glucosamine, HCl	*LXII*
D-glucosamine, base	*LXII a*
D-cyclosérine (**)	*LXIII*
Phényl-1-amino-2-propane, sulfate	*LXIV*
Mescaline, HCl	*LXV*
Mescaline, base	*LXV a*
Ammoniaque	*LXVI*
Chlorure d'ammonium	*LXVII*
Sulfate d'ammonium	*LXVIII*

(*) La cystamine nous a été procurée par le docteur Deltour, directeur scientifique des Laboratoires Labaz, 168, avenue Louise, Bruxelles; qu'il veuille bien trouver ici nos vifs remerciements.

(**) Nous devons à l'amabilité du docteur Blau, des Laboratoires Hoffmann-Laroche, 11, rue Crillon, Paris (x^e^), cet échantillon de D-cyclosérine.

L'acide β-aminobutyrique *(X)*, l'acétylméthionine *(LI)*, les α-aminoacides α-méthylés *(XXXIV - XXXIX)*, l'ammoniaque *(LXVI)*, le chlorure d'ammonium *(LXVII)* et le sulfate d'ammonium *(LXVIII)* n'ont fourni aucune trace de coloration bleue après les trois heures d'observation.

Nous n'avons pu effectuer de mesure photométrique valable avec les composés suivants qui, dans la limite de nos trois heures d'observations, fournissent des coloration différentes de celle de la DYDA :

Expérience numéro	Composé	Coloration obtenue
LXIX.....	L-cystéine, HCl	Rosée.
LXIX a....	L-cystéine, base	Rosée.
LXX.....	L-asparagine	Jaune saumon.
LXXI.....	L-proline	Jaune puis rouge.
LXXII.....	L-hydroxyproline	Rose.
LXXIII....	Glycocollate d'éthyle, HCl..	Jaune.
LXXIII a..	Glycocollate d'éthyle, base..	Jaune.
LXXIV....	Diglycylglycine	Jaune.
LXXV.....	Carnosine	Jaune foncé.
LXXVI....	Hydroxy-5-tryptamine, SO_4H_2 (complexe avec la créatinine)	Jaune.
LXXVI a...	Hydroxy-5-tryptamine, base (complexe avec la créatinine)	Jaune.
LXXVII...	Méthyl-2-amino-4-aminométhyl-5-pyrimidine, 2 HCl..	Jaune puis rouge viol.
LXXVII a..	Méthyl-2-amino-4-aminométhyl-5-pyrimidine, base...	Jaune puis rouge viol.

Enfin la cystine, la thyroxine, la DL-thyronine, la spermine, la spermidine, l'arcaïne et le sulfate de protamine ne sont pas solubles dans nos conditions expérimentales et ont été éliminés de nos essais.

2° *Discussion des résultats*

L'ensemble de nos résultats va nous permettre d'effectuer maintenant des comparaisons entre la réactivité des aminoacides avec la ninhydrine. Nous allons les suivre sur des graphiques.

Influence du signe optique de l'aminoacide

Comme on pouvait le prévoir, les formes D-, L- et DL- d'un même aminoacide possèdent la même réactivité *(II, II a, II b; VI, VI a, VI b; VII, VII a, VII b; VIII, VIII a, VIII b; XXIX, XXIX b, XXIX c; XXXII, XXXII b, XXXII c)*. Il en est de même pour les deux stéréoisomères et le racémique de la leucylglycine *(XLV, XLV a, XLV b)*; ce dernier résultat ne permet pas d'infirmer les constatations de Yanari [528], puisque l'un des deux aminoacides constitutifs de notre dipeptide est inactif par nature.

Influence de la longueur de la chaîne carbonée

Cette comparaison peut être d'abord effectuée dans la série des monoacides monoaminés aliphatiques simples à chaîne linéaire (fig. 31 A et 31 B).

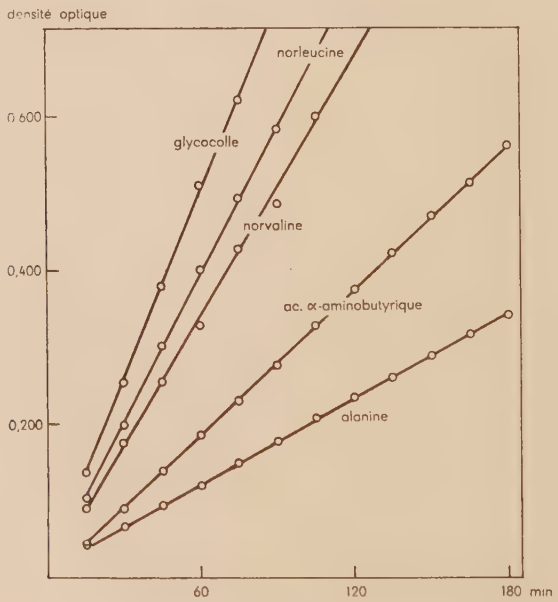


Fig. 31 A.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Influence de la longueur de la chaîne carbonée (cas des monoacides monoaminés aliphatiques à chaîne linéaire).

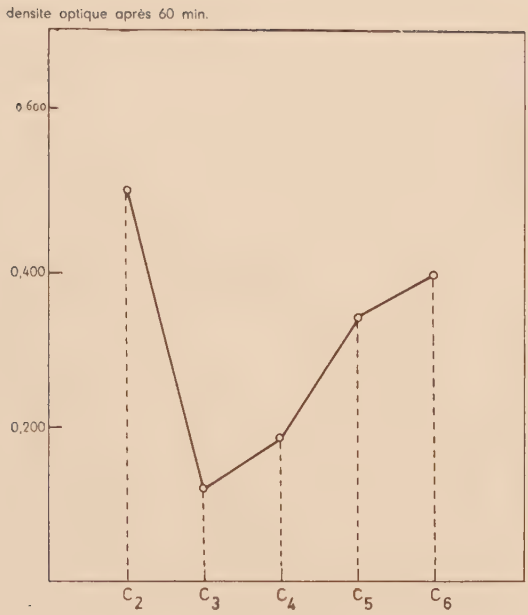


Fig. 31 B.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Influence de la longueur de la chaîne carbonée (cas des monoacides monoaminés aliphatiques à chaîne linéaire).

On remarquera que le glycocolle occupe une place privilégiée; les autres composés étudiés réagissent d'autant mieux que leur chaîne carbonée est plus longue; l'allongement de chaîne provoqué par la transformation de l'alanine en phénylalanine agit dans le même sens.

L'influence favorable de la longueur de la chaîne se retrouve dans les monoacides monoaminés ramifiés possédant en fin de chaîne le groupement isopropyle : la leucine réagit mieux que la valine (fig. 32).

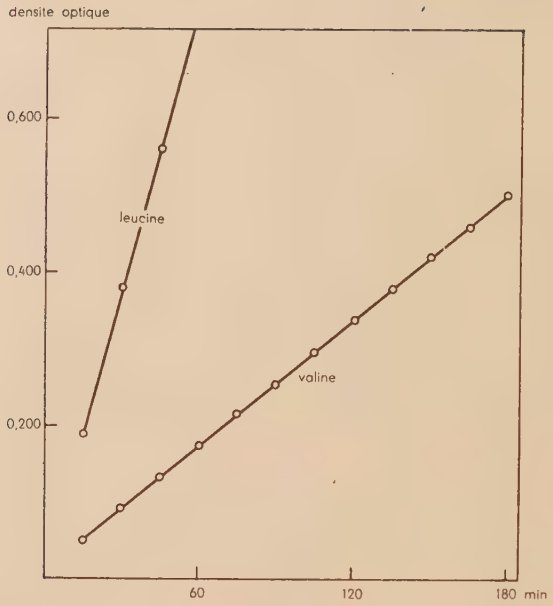


FIG. 32.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Influence de la longueur de la chaîne carbonée (cas des monoacides monoaminés aliphatiques à chaîne ramifiée).

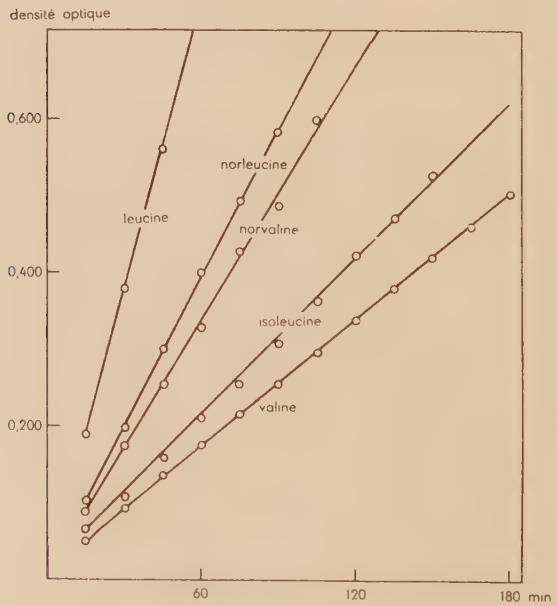


FIG. 33.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Influence de la ramification.

Influence de la ramification

La ramification de la chaîne n'amène pas toujours un effet favorable : si la norvaline se montre nettement plus réactive que la valine, la norleucine, au contraire, donne une courbe de pente plus faible que la leucine (fig. 33).

La position de la ramification entre également en ligne de compte, puisque l'isoleucine est moins active que la norleucine.

Influence combinée de la longueur de chaîne et de la ramification

L'addition d'un atome de carbone supplémentaire à la molécule d'acide α-aminobutyrique, en C_4, peut s'effectuer de deux façons différentes :

— Sous la forme d'un groupement méthylénique : on aboutit alors à la norvaline, aminoacide linéaire en C_5, de réactivité plus grande *(vide supra)* ;

— Mais aussi sous la forme d'un groupement méthyle; on obtient ainsi, selon que l'addition a été effectuée en α ou en β,

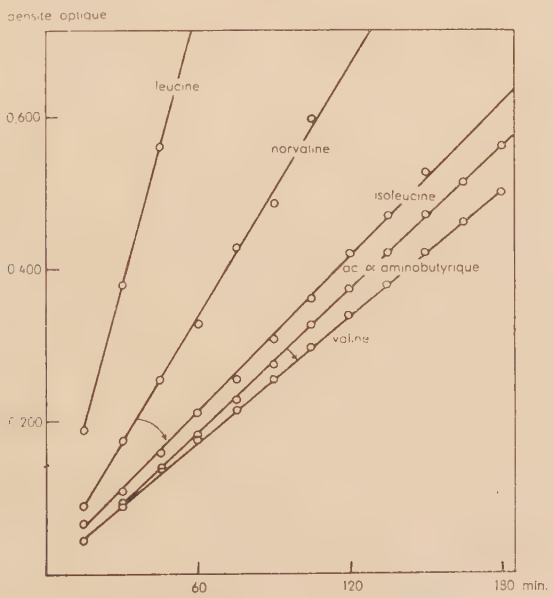


FIG. 34.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Influence combinée de la longueur de chaîne et de la ramification.

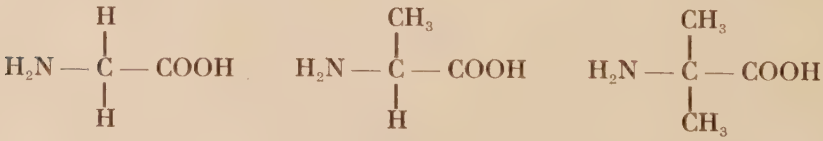
l'isovaline ou la valine. L'isovaline, ou acide α-méthyl-α-aminobutyrique, ne donne pas lieu à la formation de pourpre de Ruhemann dans nos conditions opératoires, comme d'ailleurs les autres acides α-aminés méthylés en α (voir ci-dessous). Quant à la valine, sa réactivité est inférieure à celle de l'acide α-aminobutyrique.

Cette règle a pu être confirmée sur un autre exemple : l'addition d'un groupement méthyle en position α sur la norvaline, homologue supérieur de l'acide α-aminobutyrique, conduit à l'α-méthylvaline, qui s'est montrée totalement inactive; lorsque l'addition du groupement méthylé est réalisée sur le carbone β, on obtient l'isoleucine, composé moins actif que la norvaline initiale; enfin, l'introduction sur la norvaline du groupement méthyle en position γ la transforme en leucine, aminoacide à forte réactivité.

Sur la figure 34, on peut enfin effectuer une dernière remarque : l'introduction sur l'acide α-aminobutyrique, en position β, d'un groupement éthyle (transformation en isoleucine) a une influence différente de celle amenée par l'introduction, sur le même carbone, d'un groupement méthyle (transformation en valine).

Influence de la substitution du carbone en α

Dans la partie théorique (voir p. 56), nous avons déjà insisté sur le rôle important des atomes d'hydrogène en position α, en ce qui concerne la réactivité des amines primaires avec la ninhydrine. Les essais que nous avons effectués avec les acides aminés confirment que la réactivité d'un composé se montre d'autant plus nette que le carbone en α possède plus d'atomes d'hydrogène.



Glycocolle — Alanine — Acide α-aminoisobutyrique ou α-méthylalanine

L'alanine peut être considérée comme un dérivé monométhylé du glycocolle, tandis que l'acide α-aminoisobutyrique ou α-méthylalanine correspond au produit diméthylé. Or nous avons observé la séquence :

glycocolle > alanine > ac. α-aminoisobutyrique.

Dans nos conditions expérimentales, cet aminoacide α-méthylé n'a donné lieu à aucune formation de DYDA, ce qui implique que la décarboxylation du composé ne s'est pas produite, car elle aurait entraîné la migration sur le carbone en α de l'atome d'hydrogène nécessaire à l'obtention du pourpre de Ruhemann; rappelons toutefois à ce sujet que le produit de décarboxylation de l'α-méthylalanine, l'isopropylamine, ne manifeste vis-à-vis de la ninhydrine qu'une faible réactivité [525, 345].

L'absence de réactivité de l'acide α-aminoisobutyrique peut se généraliser aux autres acides α-aminés-α-méthylés : en plus de l'isovaline et de l'α-méthylvaline déjà signalées plus haut, l'α-méthylsérine, l'α-méthylphénylalanine et l'α-méthyltryptophanne ne nous ont pas fourni de coloration bleue; ceci apparaît d'autant plus remarquable pour ces deux derniers aminoacides dont les homologues non méthylés donnent lieu à une intense production de pourpre de Ruhemann.

Influence de la position respective du groupement acide et du groupement amine

Les acides α-aminés réagissent mieux que les β- ou les

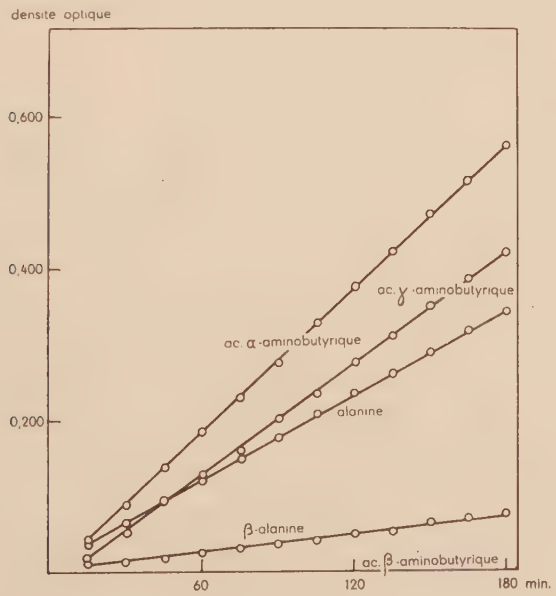


Fig. 35.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Influence de la position respective des groupements acide et amine.

γ-aminoacides correspondants : l'alanine donne plus vite la coloration que la β-alanine (fig. 35), l'acide α-aminobutyrique que l'acide γ-aminobutyrique. Le cas de l'acide β-aminobutyrique mérite une attention particulière, car ce produit n'a donné lieu à aucune coloration dans nos conditions expérimentales; même après chauffage prolongé, on n'observe qu'une très faible coloration bleue. Cet acide aminé se rapproche de l'isopropylamine, dont Yamagishi a signalé la faible réactivité (voir plus haut, p. 56) ; on peut le considérer en effet comme une carboxyisopropylamine, composé dans lequel l'éloignement du groupement carboxylique est trop important pour modifier la migration de l'hydrogène dans la base de Schiff formée par action de la ninhydrine.

Dans la base de Schiff formée aux dépens de l'acide γ-aminobutyrique, le carboxyle est encore plus éloigné, mais le carbone sur lequel est fixé le groupement $-NH_2$ est un carbone primaire.

Aminoacides hydroxylés

La présence d'un groupement hydroxylé dans la chaîne d'un aminoacide aliphatique augmente sa réactivité vis-à-vis de la ninhydrine lorsque cette réactivité est faible : la sérine donne plus vite la coloration bleue que l'alanine.

Au contraire, l'adjonction d'un hydroxyle sur la chaîne de l'homologue supérieur de l'alanine, l'acide α-aminobutyrique, aminoacide plus réactif, entraîne des effets différents :

— Si cette adjonction s'effectue sur le carbone terminal, l'acide α-aminobutyrique est transformé en homosérine, dont la réactivité est légèrement supérieure à celle de l'aminoacide non alcoolique;

— L'introduction d'un $-OH$ sur le carbone β de l'acide α-aminobutyrique conduit à la thréonine, aminoacide à fonction alcool secondaire dont la réactivité vis-à-vis de la tricétone apparaît nettement inférieure.

Si nous limitons la comparaison aux seuls aminoacides hydroxylés, nous constatons, comme pour les aminoacides aliphatiques simples, une influence favorable de la longueur de la chaîne puisqu'on note la séquence :

$$\begin{matrix} \text{sérine} \\ C_3 \end{matrix} \diagup\diagdown \begin{matrix} \text{thréonine} \\ C_4 \end{matrix} \diagup\diagdown \begin{matrix} \text{homosérine} \\ C_4 \end{matrix}$$

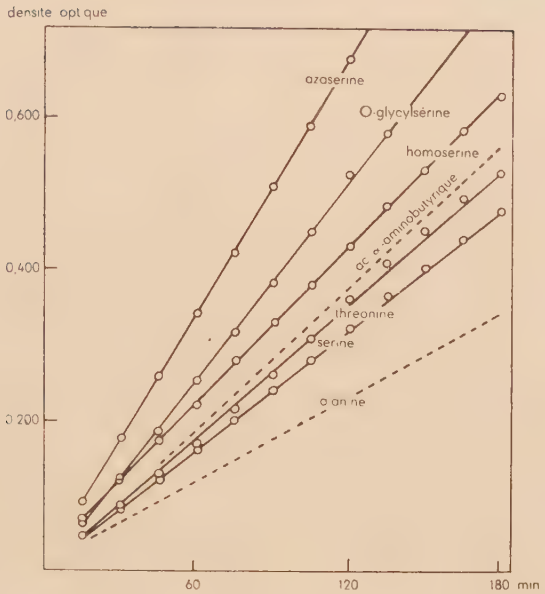
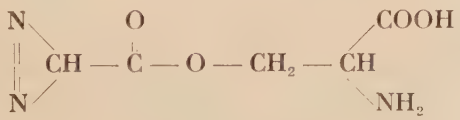


Fig. 36.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

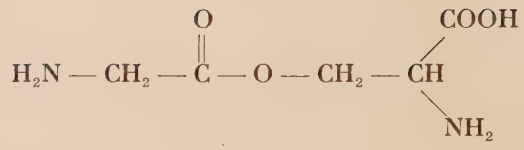
Cas des aminoacides hydroxylés.

Nous avons eu l'opportunité (*) de pouvoir examiner deux dérivés de la sérine, l'azasérine et l'ester aminoacétique de la sérine. Le premier de ces composés est le nom abréviatif de l'O-diazoacétylsérine, substance préparée par synthèse [301, 329], qui s'est montrée identique à un antibiotique extrait d'une souche particulière de *Streptomyces* [133, 291] ; cet antibiotique tire son intérêt du fait qu'il manifeste des propriétés intéressantes vis-à-vis du développement de certaines tumeurs expérimentales [442] ; l'ester aminoacétique de la sérine, ou O-glycylsérine, constitue un intermédiaire de synthèse de l'azasérine.



O-diazoacétylsérine

(*) Voir note de bas de page, p. 160.



O-glycylsérine

L'azasérine réagit très vivement avec la ninhydrine, probablement en raison de la longueur de sa chaîne. L'O-glycylsérine se montre également apte à donner le colorant bleu : sa moindre réactivité par rapport à l'azasérine provient vraisemblablement de la présence à l'extrémité de la molécule d'une fonction amine; nous verrons plus loin que les diaminomonoacides manifestent en effet une réactivité restreinte vis-à-vis de la ninhydrine; ceci est corroboré par l'obtention d'une droite de pente inférieure avec l'ester aminoacétique de la sérine lorsque ce composé est étudié à l'état de base et non de chlorhydrate.

Aminoacides soufrés

La cystéine ne donne pas, avec la ninhydrine, le colorant bleu fourni par les autres aminoacides : ceci est probablement en rapport avec la formation du produit décrit par Kuhn et Hammer [249]. L'homocystéine ne peut donner lieu à une cyclisation analogue : aussi, avons-nous constaté que ce dernier aminoacide donne une quantité notable de pourpre de Ruhemann; l'étude quantitative de la réaction colorée n'a pas été réalisée. La cystine est trop peu soluble pour pouvoir être étudiée.

L'acide cystéique, qui ne possède plus de groupement thiol à son extrémité, ne donne pas lieu non plus à la réaction de cyclisation notée avec la cystéine; le développement de la coloration bleue s'effectue assez rapidement, plus rapidement même qu'avec son homologue carboxylé, l'acide aspartique (voir ci-dessous) ; le sel de sodium réagit plus faiblement.

Le produit de décarboxylation de l'acide cystéique est constitué par la taurine, acide aminé β-sulfonique; ici encore, nous constatons que la taurine se montre plus réactive que la β-alanine qui en constitue l'homologue carboxylique. Le sel de sodium de la taurine est légèrement plus actif.

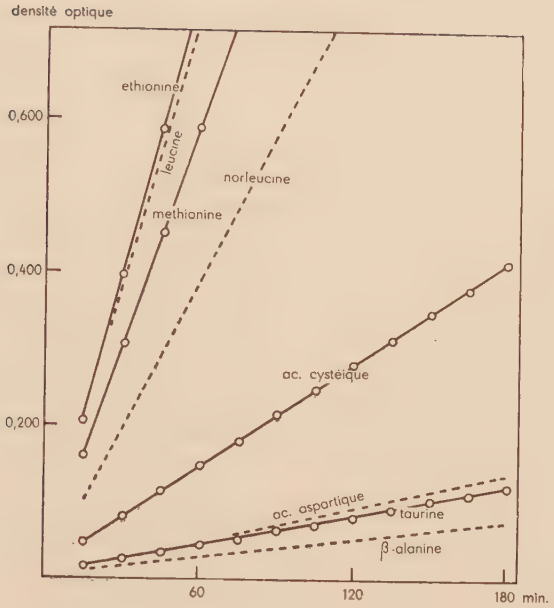


Fig. 37.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Cas des aminoacides soufrés.

La méthionine se range parmi les aminoacides très actifs; en admettant que l'atome de soufre du groupement thiométhyl possède le même encombrement spatial qu'un groupement méthylénique, la méthionine peut être comparée avec les monoacides monoaminés aliphatiques en C_6 : elle se situe effectivement entre la leucine et la norleucine.

L'éthionine, homologue supérieur de la méthionine, nous apporte un nouvel exemple de l'influence favorable de la longueur de la chaîne sur la réactivité de l'aminoacide.

La décomposition de l'acide L-cystéine-sulfinique par la ninhydrine a été étudiée par Fromageot et coll. [157 a].

Diacides monoaminés

Nous avons étudié les acides aspartique et glutamique; ce dernier apparaît nettement plus réactif. On serait tenté d'invoquer ici également l'influence du nombre d'atomes de carbone formant la chaîne linéaire; cette possibilité ne doit pas nous faire négliger une seconde hypothèse basée sur

l'influence défavorable, sur la réactivité du groupement α-aminoacide, d'un deuxième groupement carboxylique.

Nous constatons en effet que l'acide aspartique réagit bien moins que l'acide α-aminobutyrique, de même que l'acide glutamique apparaît inférieur à la norvaline. Il est donc possible que la supériorité de l'acide glutamique sur son homologue inférieur provienne plus de l'éloignement du groupement ω-carboxylique que de l'allongement de la chaîne carbonée.

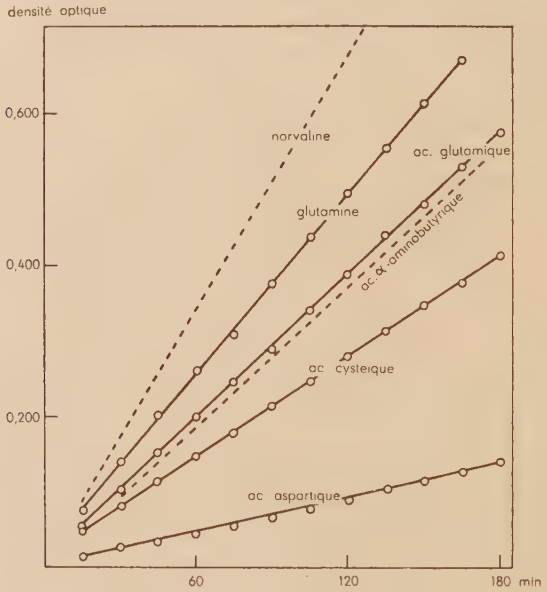


Fig. 38.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Cas des diacides monoaminés.

L'influence défavorable du groupement ω-carboxylique est confirmée par la réactivité plus grande, par rapport à l'acide glutamique, de la glutamine, dont le carboxyle terminal est engagé dans une liaison amide. L'asparagine n'a pu être étudiée quantitativement, en raison de la coloration différente qu'elle fournit avec la ninhydrine.

Notons enfin que le groupement acide sulfonique inhibe moins fortement que le groupement carboxylique la réactivité du groupement α-aminoacide puisque, comme nous l'avons

signalé ci-dessus, l'acide cystéique apparaît plus réactif que l'acide aspartique; l'aminoacide soufré demeure cependant inférieur à l'acide α-aminobutyrique.

Diaminomonoacides

On aurait pu croire que les diaminomonoacides, substances possédant à chaque extrémité de leur molécule un groupement aminé capable de réagir avec la ninhydrine, allaient donner lieu à une quantité importante de pigment bleu : il n'en est rien. Yamagishi [524], il est vrai, avait déjà noté que certaines diamines (putrescine et cadavérine) ne fournissent pas plus de colorant qu'une monoamine. Nos essais ont prouvé que les deux diaminoacides les plus simples, l'ornithine et la lysine manifestent une réactivité très faible dans nos conditions expérimentales, qu'on les étudie sous la forme de la base, du mono- ou du dichlorhydrate. Cette faible réactivité apparaît d'autant mieux si l'on compare les diaminoacides aux aminoacides simples qui leur correspondent, la norvaline et la norleucine. Le groupement ω-aminé apparaît

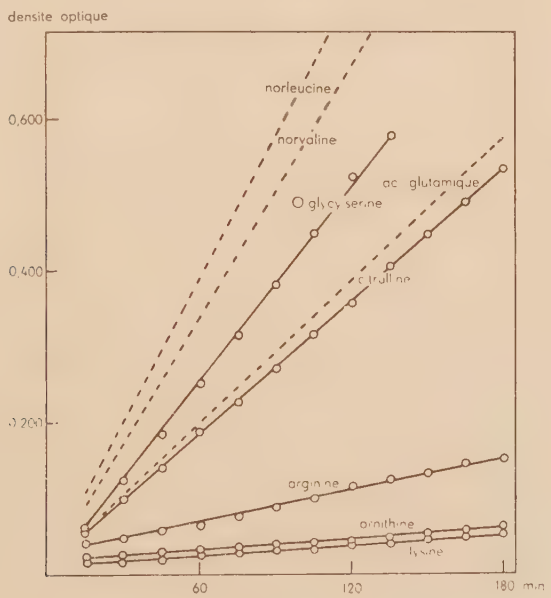


Fig. 39.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Cas des diaminomonoacides.

donc nettement inhibiteur, plus encore que le groupement ω-carboxylique, puisque l'acide glutamique est plus réactif que l'ornithine.

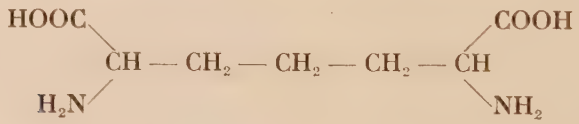
La substitution du groupement aminé terminal de l'ornithine augmente la réactivité des nouveaux aminoacides ainsi créés, ceci d'autant plus que le substituant est moins basique; on observe en effet la séquence :

ornithine < arginine < citrulline.

Il convient d'inclure également dans la rubrique des diaminomonoacides, l'ester aminoacétique de la sérine, qui possède également un groupement aminé aux deux extrémités de sa molécule; comme dans la citrulline, la présence d'un groupement carbonylé au voisinage du groupement ω-aminé doit limiter l'effet inhibiteur de cette fonction.

Acide diaminopimélique

L'acide α,ε-diaminopimélique est un acide aminé naturel récemment découvert par Work dans les corps microbiens de *Corynebacterium diphteriae* [519 a, 519 b]. Comme le montre la formule ci-dessous, il s'agit d'un composé possédant à chacune de ses extrémités le groupement acide α-aminé :



L'acide α,ε-diaminopimélique peut être considéré comme une ε-carboxylysine; sa réactivité apparaît nettement supérieure à celle de la lysine (fig. 40, I), mais l'expérience *XXVIII* n'est pas strictement comparable à l'essai *XXV* en raison de la présence des deux groupements acide α-aminé dans le premier composé.

Dans l'expérience *XXVIII a* (fig. 40, II), la concentration en acide diaminopimélique a été réduite de moitié afin de permettre la comparaison avec les autres monoaminomonoacides. La réactivité de l'acide diaminopimélique (dont chaque groupement acide aminé correspond à 3,5 atomes de carbone) apparaît nettement inférieure à celles de l'alanine (en C_3) et de l'acide α-aminobutyrique (en C_4) : c'est qu'en effet les deux fonctions acide-aminé ne peuvent ici réagir d'une manière

absolument indépendante l'une de l'autre puisqu'elles font partie de la même chaîne carbonée.

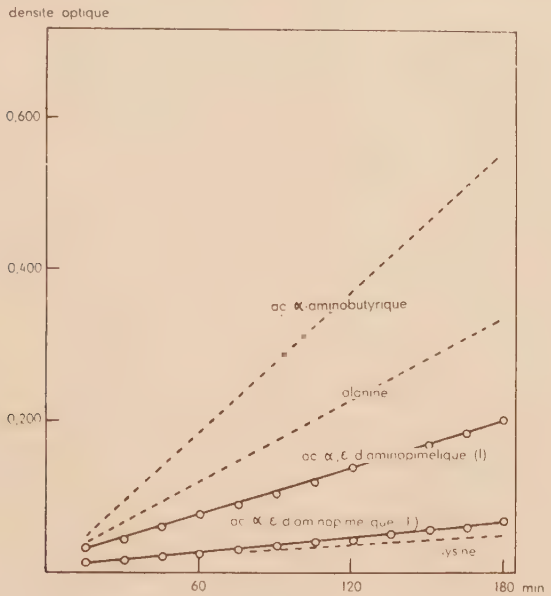


Fig. 40.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Cas de l'acide α,ε-diaminopimélique.

I : expérience *XXVIII*.

II : expérience *XXVIII a*.

Aminoacides benzéniques

Le nombre des essais réalisés dans cette série a dû être limité en raison de l'insolubilité de plusieurs représentants (tyrosine, thyroxine, thyronine).

La phénylalanine, le sel de sodium de la tyrosine comme la dioxyphénylalanine donnent lieu à une production importante de pigment bleu. Les comparaisons entre ces différents aminoacides apparaissent toutefois difficiles, en raison :

— De la nécessité d'étudier la tyrosine sous la forme de son sel monosodique, non comparable au sel de sodium de la phénylalanine;

— De l'oxydation spontanée à l'air de la dopa; remarquons que les chiffres indiqués dans le tableau XXIV ont été notés

en prenant comme témoin une solution de dopa dans le milieu réactionnel privé de ninhydrine; ce témoin évolue sensiblement pendant les trois heures de notre protocole d'observation.

On remarquera sur la figure 41 que, tandis que la phényl-

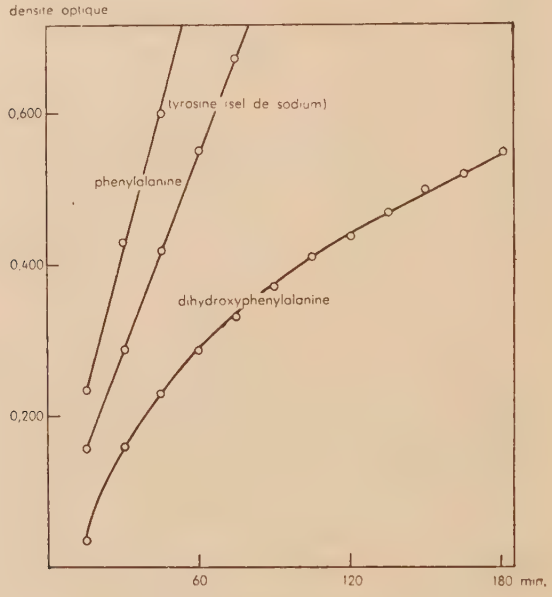


Fig. 41.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Cas des aminoacides benzéniques.

alanine et la tyrosine présentent une vitesse constante de formation du colorant en fonction du temps, il n'en est pas de même de la dopa; quoi qu'il en soit, ces trois dérivés de l'alanine apparaissent beaucoup plus réactifs que l'aminoacide aliphatique en C_3.

Aminoacides hétérocycliques

L'histidine, comme le tryptophanne, se placent en tête des aminoacides que nous avons étudiés, dépassant le glycocolle. Cette position particulière nous permet de négliger la présence d'impuretés dans l'échantillon de tryptophanne utilisé dans notre expérimentation.

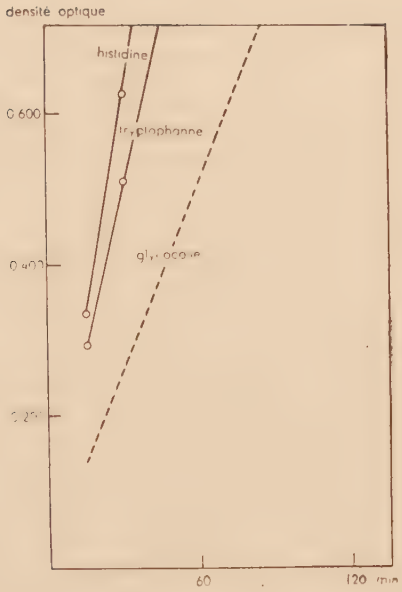


Fig. 42.

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides.

Cas des aminoacides hétérocycliques.

Oligopeptides

L'examen des figures 43 A, 43 B, 43 C et 43 D, sur lesquelles nous avons réuni l'ensemble de nos résultats concernant les peptides, nous permet de formuler les remarques suivantes :

— La cinétique d'apparition du colorant bleu s'avère différente avec les peptides : tandis que les tracés représentatifs étaient presque toujours des droites pour les aminoacides, nous observons ici des courbes à concavité supérieure traduisant une augmentation de la vitesse de la réaction en fonction du temps.

— Tous les glycyl-, alanyl-, leucyl- et histidyl-peptides examinés possèdent une réactivité plus faible, respectivement, que celle du glycocolle, de l'alanine, de la leucine et de l'histidine.

— Les glycylpeptides, comme l'avaient remarqué déjà d'autres auteurs (voir p. 61), possèdent une nette réactivité avec la ninhydrine. L'influence favorisante de la longueur de la

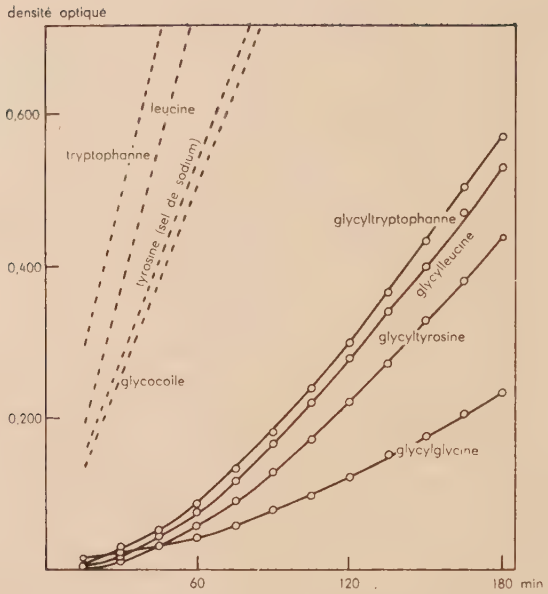


FIG. 43 A.

Cinétique de la réaction ninhydrine-peptides.
Cas des glycylpeptides.

FIG. 43 B.

Cinétique de la réaction ninhydrine-peptides.
Cas des alanylpeptides.

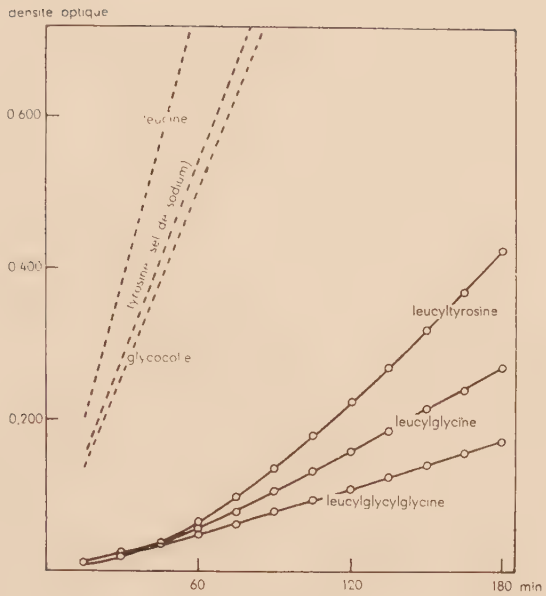


FIG. 43 C.

Cinétique de la réaction ninhydrine-peptides.
Cas des leucylpeptides.

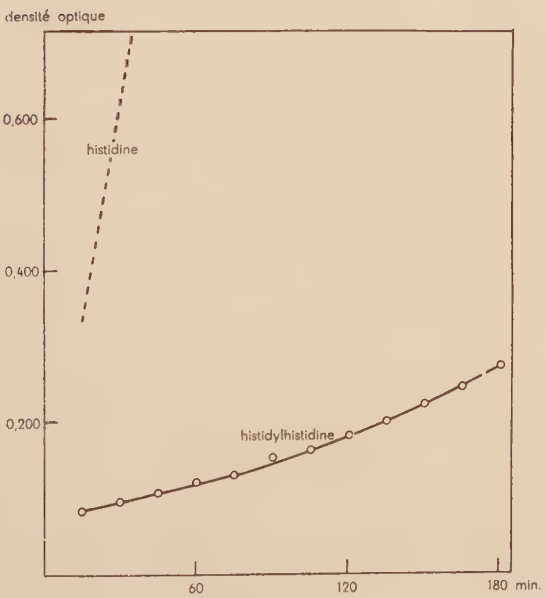


FIG. 43 D.

Cinétique de la réaction ninhydrine-peptides.
Cas de l'histidylhistidine (*).

(*) Le mélange réalisé est trouble au début de l'expérience et s'éclaircit par la suite, d'où la forte densité optique du départ.

chaîne carbonée de l'acide aminé à carboxyle libre se manifeste au sein même du peptide, puisque l'on note :

glycylglycine < glycyltryptophanne.
glycyltyrosine
glycylleucine

Remarquons le cas particulier de la diglycylglycine, qui fournit une coloration jaune; ce tripeptide donne par ailleurs une réaction normale avec la ninhydrine [102, 395].

— L'alanylglycine apparaît moins réactive que la glycylglycine et que la leucylglycine, ce qui confirme la position moins privilégiée de l'alanine par rapport au glycocolle et à la leucine (voir p. 164 et 166).

— Les leucylpeptides ont donné lieu jusqu'ici à des résultats contradictoires. Tandis que certains auteurs montrent, aussi bien par la colorimétrie [305] que par la mesure de l'ammoniac libéré [102, 395], la faible réactivité des leucylpeptides, Yanari [528], au contraire, montre que dans certains cas le leucylpeptide réagit mieux que le glycylpeptide correspondant. Nous confirmons les résultats du travailleur de Chicago avec les séquences :

— Leucylglycine > glycylglycine

— Leucylglycylglycine > diglycylglycine

— La réactivité de la leucyltyrosine est du même ordre de grandeur que celle de la glycyltyrosine.

Par ailleurs, à l'intérieur du groupe des leucylpeptides, les séquences sont analogues à celles des glycylpeptides puisque nous avons noté :

— Leucylglycylglycine < leucylglycine < leucyltyrosine.

— Diglycylglycine < glycylglycine < glycyltyrosine.

Produits de substitution et dérivés des aminoacides

Les peptides nous ont fourni un premier exemple de dérivés de substitution des aminoacides. Les produits que nous étudions maintenant possèdent une structure chimique plus simple.

La substitution du groupement amine primaire d'un aminoacide inhibe presque totalement sa réactivité avec la ninhydrine, dans nos conditions opératoires : c'est ce que nous avons observé avec le N-méthylglycocolle (sarcosine) et la DL-acétylméthionine.

Nous n'avons examiné l'influence de l'estérification du grou-

pement carboxylique que sur le seul exemple du glycocollate d'éthyle, qui ne donne avec la ninhydrine, après une coloration jaune, qu'une coloration bleue très tardive. Par ailleurs, la réduction du groupement carboxylique en alcool primaire diminue très fortement la vitesse de formation de la DYDA : c'est ce que nous constatons en comparant au glycocolle (acide aminoacétique) la colamine (aminoéthanol).

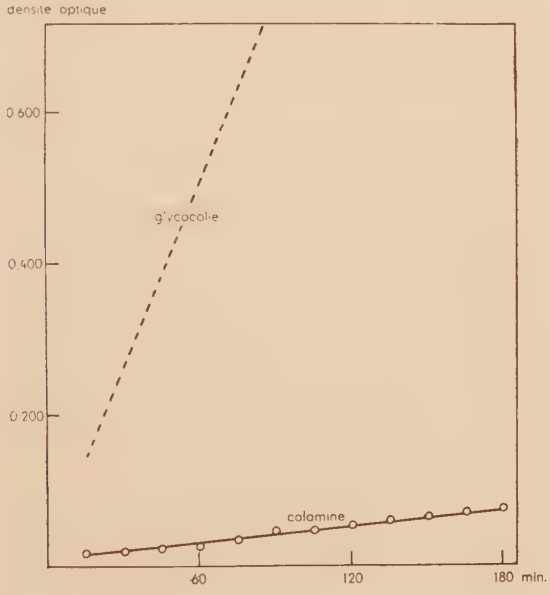


Fig. 44.

Cinétique de la réaction ninhydrine-colamine.

Monoamines dérivées des aminoacides

La décarboxylation des monoaminomonoacides, processus physiologique facilement reproductible au laboratoire par voie enzymatique ou par voie chimique, conduit à une monoamine possédant bien évidemment un carbone de moins que l'aminoacide qui lui a donné naissance. Les amines dérivées des acides aminés étant des amines primaires, donc susceptibles de réagir avec la ninhydrine, nous avons tenu à effectuer la mesure de leur cinétique dans les mêmes conditions que pour les aminoacides.

Les amines ont été étudiées directement ou sous la forme

de leur chlorhydrate, en raison de la faible teneur en tampon phosphate de notre mélange réactionnel. Dans tous les cas, les bases se sont montrées plus réactives que les chlorhydrates.

Toutes ces amines ont une vitesse de réaction plus faible que celle de l'aminoacide correspondant, puisque l'on note :

n-propylamine < acide α-aminobutyrique
n-butylamine < norvaline
isobutylamine < valine
tyramine < tyrosine
histamine < histidine
tryptamine < tryptophanne.

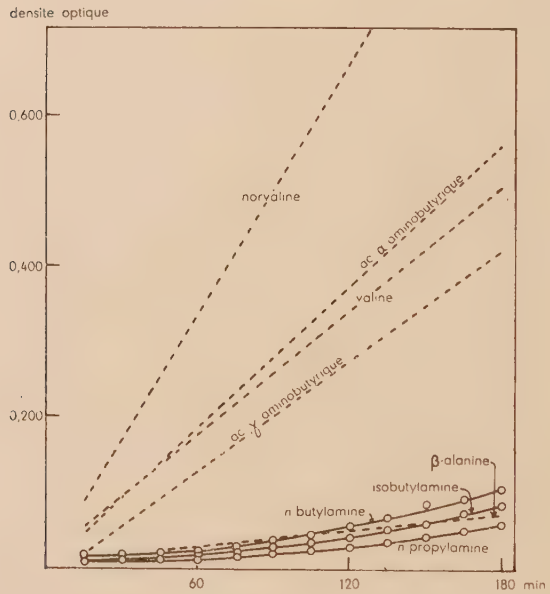


Fig. 45 A.

Cinétique de la réaction ninhydrine-amines aliphatiques.

La réactivité plus grande des acides α-aminés, par rapport aux amines primaires correspondantes, démontre bien le rôle favorisant du groupement carboxylique en α du groupement aminé, rôle que nous avons déjà aperçu dans notre partie théorique en examinant le mécanisme électronique de la réaction de Strecker. Le groupement carboxylique peut d'ailleurs

manifester son action favorable lorsqu'il se trouve plus éloigné de la fonction amine primaire. Nous pouvons en effet effectuer des comparaisons entre la *n*-propylamine et la

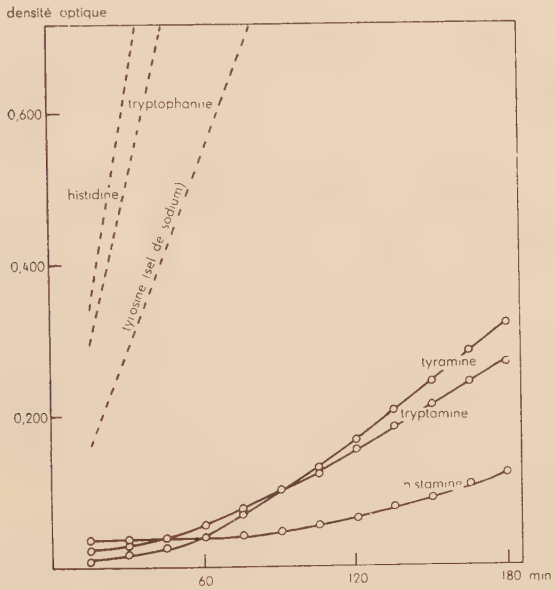


Fig. 45 B.

Cinétique de la réaction
ninhydrine-amines cycliques.

β-alanine, toutes deux en C_3 et entre les deux composés en C_4, représentés par la *n*-butylamine et l'acide γ-aminobutyrique; nous notons, en effet :

n-propylamine < β-alanine
n-butylamine < acide γ-aminobutyrique.

Diamines dérivées des aminoacides

La réaction de décarboxylation appliquée aux diaminomonoacides ou aux diaminodiacides conduit à des diamines primaires, dont nous avons étudié quatre exemples sous forme de base et de leur chlorhydrate; comme pour les monoamines, les bases se sont montrées plus réactives que les chlorhydrates, sauf pour la tétraméthylènediamine (putrescine) et la pentaméthylènediamine (cadavérine), composés tous deux facilement cyclisables [524].

Ici encore, les amines sont moins réactives que les amino-acides dont elles dérivent (putrescine < ornithine; agmatine < arginine), sauf toutefois la cadavérine dont la réactivité est pratiquement la même que celle de la lysine.

Si nous admettons que la liaison disulfure de la cystamine est équivalente du groupement $—(CH_2)_2—$, on peut encore retrouver l'influence favorisante de la longueur de chaîne dans la séquence :

cystamine > cadavérine > putrescine.

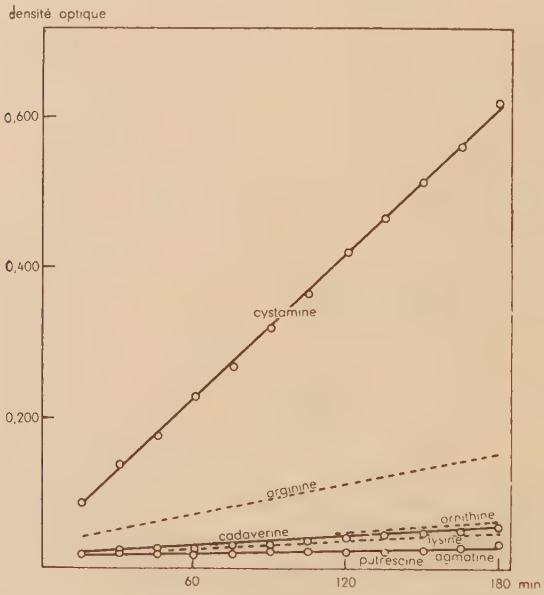


Fig. 46.

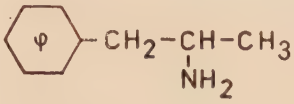
Cinétique de la réaction ninhydrine-diamines.

Rappelons que la spermine, la spermidine et l'arcaïne n'ont pu trouver place dans notre étude en raison de leur trop faible solubilité en présence de butanol tertiaire.

Divers composés d'intérêt biologique

L'ammoniaque et les deux sels d'ammonium minéraux étudiés ne réagissent pas dans les conditions où nous les avons utilisés. Il en est pratiquement de même du sulfate de phényl-

1-amino-2-propane, substance bien connue des thérapeutes (*).



Phényl-1-amino-2-propane.

Cette absence de réactivité provient de la fixation de la fonction amine primaire sur un carbone secondaire, comme dans l'isopropylamine [525] ou dans l'acide β-aminobutyrique (voir plus haut, p. 169).

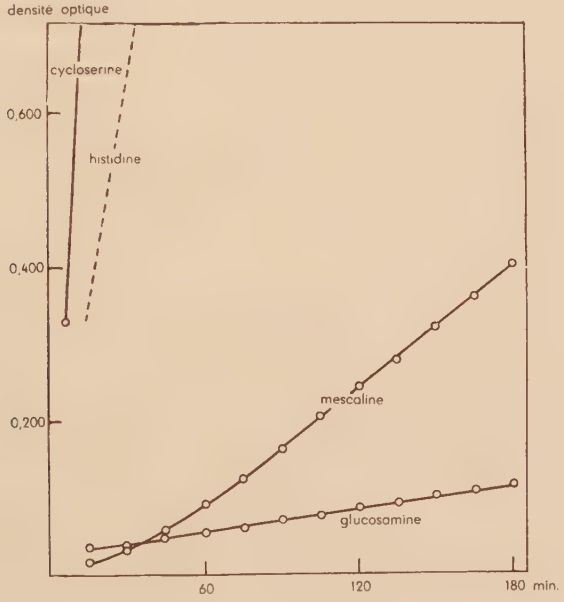
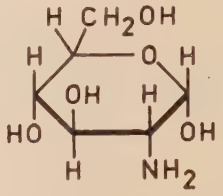


Fig. 47.

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec quelques composés d'intérêt biologique.

(*) Spécialisé en France sous le nom d'ortédrine; nous remercions les Laboratoires Spécia de nous avoir généreusement procuré un échantillon de ce produit.

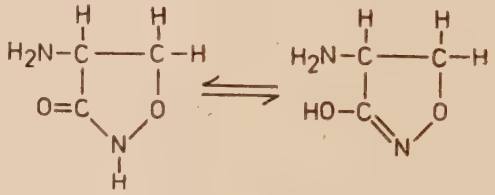
La réactivité nettement plus marquée de la D-glucosamine-2 s'explique vraisemblablement, malgré le rattachement du



D-glucosamine-2.

groupement amine primaire sur un carbone secondaire, par la proximité de la liaison pseudo-acétalique du carbone 1.

La D-cyclosérine s'est avérée, en présence de butanol tertiaire, la plus réactive de toutes les substances que nous avons étudiées (*). On sait que cette substance est un anti-



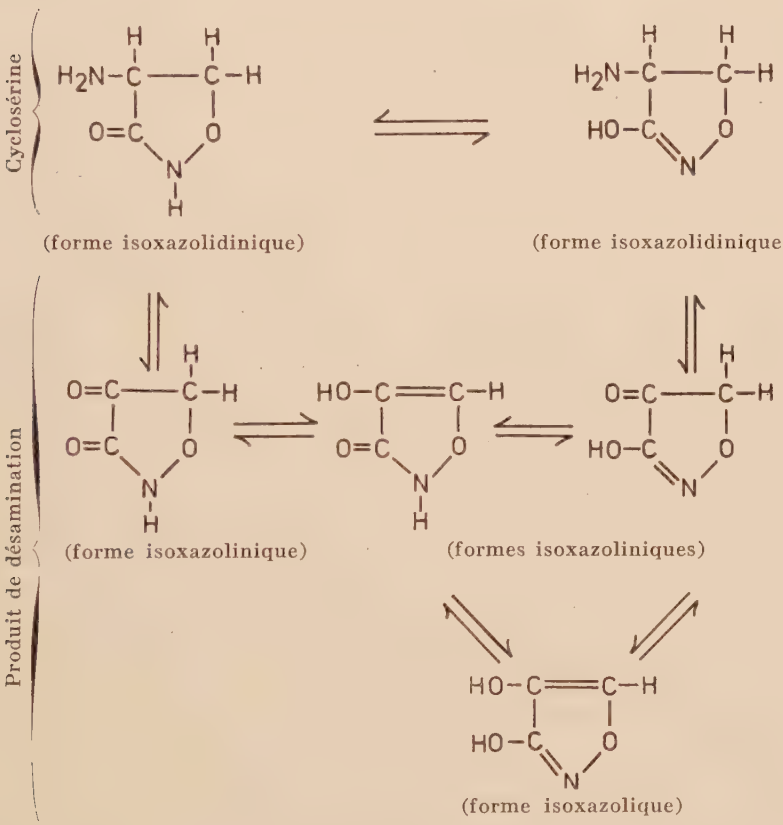
D-cyclosérine.

biotique qui a été récemment isolé par différents groupes de chercheurs américains des cultures de *Streptomyces orchidaceus* [193], de *Streptomyces garyphatus* [194] ou de *Streptomyces lavendulae* [426] ; la cyclosérine possède la structure de la D-amino-4-isoxazolidinone-3 [209, 247] et a pu être reproduite par synthèse [437]. Cette substance, qui possède un spectre d'action antibiotique étendu [503] et s'avère relativement peu toxique [22, 95, 434], a surtout retenu l'attention des médecins en raison de son action marquée sur le bacille de Koch [30, 104, 439] (**) ; signalons encore l'interférence de la cyclosérine dans le métabolisme des purines [217].

(*) Une étude plus détaillée de cette réaction sera publiée ultérieurement [326].

(**) Pour plus de détails sur la cyclosérine, consulter la revue récente de Piccinelli [349], ainsi que les « Transactions of the 15th Conference on the Chemotherapy of Tuberculosis; 1 vol., Veterans Adm., édit., Saint-Louis, Mo, 1956 » (pp. 331-396).

L'existence de l'hétérocycle isoxazolique explique la réactivité de l'antibiotique avec le nitroprussiate de sodium en milieu alcalin [222]. Son extrême réactivité avec la ninhydrine, qui n'a jamais été mentionnée, doit être en rapport avec la possibilité d'existence de quatre formes de résonance pour le produit de désamination, comme le montre le schéma ci-dessous :



*
**

L'étude comparée de la réactivité des nombreuses substances précitées n'est, bien entendu, valable que dans nos conditions expérimentales et ne saurait être généralisée. En milieu de faible constante diélectrique, la cinétique d'action des divers aminoacides avec la ninhydrine doit dépendre d'au moins deux facteurs :

— De la facilité de passage du zwitterion à la forme électriquement neutre, c'est-à-dire de la transformation d'un groupement amine non réactif en groupement amine réactif;

— De la réactivité propre de ce groupement aminé, influencée par l'architecture générale de la molécule.

Des essais préliminaires nous ont d'ailleurs montré que les aminoacides ne se classent pas suivant la même séquence en milieu purement aqueux ou en présence d'un autre alcool que le butanol tertiaire; nous rapportons ci-dessous quelques exemples de séquences caractéristiques relevées dans différents solvants :

Butanol tertiaire a 75 p. 100	Ethanol a 60 p. 100	Eau
Phénylalanine > glycocolle	Glycocolle > phénylalanine	Glycocolle > phénylalanine
Leucine > glycocolle		Glycocolle > leucine
Norleucine > norvaline	Norleucine > norvaline	Norvaline > norleucine
Cyclosérine > histidine		Histidine > cyclosérine
Isoleucine > alanine		Alanine > isoleucine

Bien plus, dans le même milieu, les séquences notées avec la ninhydrine diffèrent de celles fournies par l'alloxanne, malgré la parenté des deux polycétones; en présence d'alcool butylique tertiaire à 75 p. 100, on note en effet :

— Avec la ninhydrine : phénylalanine > glycocolle;
— Avec l'alloxanne : glycocolle > phénylalanine.

Section II

Etude chromatographique de la réaction ninhydrine-aminoacides

Si la ninhydrine doit une grande partie de son utilisation actuelle à la chromatographie sur papier, il est curieux de remarquer que cette technique si simple n'a pratiquement jamais été employée pour pénétrer le détail de la réaction ninhydrine-aminoacides. Nous n'avons en effet trouvé dans la littérature mention que du seul mémoire de Stoffyn et Jeanloz [443], qui mettent en œuvre la séparation chromatographique pour étudier la désamination des osamines par la

ninhydrine. Nous apportons ici quelques résultats obtenus en suivant trois voies différentes :

— Etude de la réaction ninhydrine-aminoacides en milieu aqueux;

— Etude de la réaction ninhydrine-aminoacides en présence d'éthanol;

— Essai de caractérisation chromatographique des aldéhydes libérés par la dégradation de Strecker.

I. — RÉACTION NINHYDRINE-AMINOACIDES EN MILIEU AQUEUX

Nous avons fait réagir la ninhydrine sur divers aminoacides en suivant le protocole ci-dessous :

— Aminoacide ..... 6,25 µM/ml
— Ninhydrine ..... 12,5 µM/ml

en solution dans un tampon standard de McIlvaine (*), dilué au demi, aux *p*H de 5,0, 7,0 et 8,0. Le mélange contenu dans des tubes à essais ouverts est maintenu dix minutes dans un bain-marie bouillant. Les tubes sont alors refroidis sous un courant d'eau froide; on prélève 15 µl du liquide coloré pour réaliser la chromatographie. Plusieurs aminoacides différents ont été ainsi examinés dans trois conditions de *p*H différentes.

Pour effectuer la séparation chromatographique, nous avons éliminé *a priori* les phases solvantes trop acides (butanol acétique par exemple) susceptibles de modifier trop profondément le *p*H des mélanges étudiés. Les systèmes contenant du phénol ont dû être proscrits, car nous avons constaté que ce produit détruit les pigments formés au cours de leur cheminement sur le papier. Dans presque tous nos essais, nous avons employé le *n*-butanol saturé d'eau et le papier Schleicher et Schüll 2043 b. Nous avons également effectué des séparations chromatographiques avec du butanol saturé par le tampon dans lequel la réaction ninhydrine-aminoacide avait eu lieu, mais les séparations n'ont pas été supérieures à celles obtenues avec le simple butanol saturé d'eau; il en est de même d'essais réalisés sur du papier préalablement imprégné du tampon au même *p*H.

Nous ne donnerons pas ici le détail de nos résultats, nous

(*) Voir Hodgman (C. D.), Handbook of Chemistry and Physics, 1 vol., 36e éd., 3173 p., Chemical Rubber Publ. Co., édit., Cleveland (Ohio), 1954-1955, p. 1617.

réservant de le faire dans des publications ultérieures. Nous indiquerons simplement, dans leurs grandes lignes, les constatations que nous avons pu effectuer.

A. — Caractérisation de la DYDA

Dans notre partie théorique (voir p. 41), nous avons souligné que la nature même du pigment bleu développé au cours de la réaction ninhydrine-aminoacides avait donné lieu à des controverses, certains admettant avec Ruhemann la formation de dicétohydrindylidène-dicétohydrindamine (DYDA), d'autres ayant montré la formation d'un produit coloré non azoté, notamment de bis-dicétoindanyle (voir p. 49).

Nous avons tout d'abord préparé le sel d'ammonium de la DYDA selon la technique de Ruhemann [391], par action sur l'hydrindantine d'une solution d'acétate d'ammonium saturée de gaz carbonique. Le produit obtenu, épuisé à l'eau bouillante puis relargué par le chlorure d'ammonium, se présente sous la forme d'aiguilles rouges solubles dans l'eau en bleu violacé.

Sur les chromatogrammes, la DYDA-NH_4 se présente sous la forme d'un spot mauve, absorbant la lumière ultraviolette. Avec le butanol saturé d'eau comme phase solvante, son Rf est de 0,52. Dans d'autres systèmes chromatographiques, la DYDA-NH_4 se présente souvent sous la forme de traînées colorées dont il est évidemment difficile de préciser le Rf.

Nous avons constaté que chaque fois que la réaction ninhydrine-aminoacides donne naissance à une coloration bleue, on retrouve sur le chromatogramme le spot de la DYDA-NH_4.

Nos essais nous ont montré depuis que la DYDA-NH_4 n'était pas toujours la seule substance colorée à prendre naissance au cours de la réaction. Deux facteurs principaux conditionnent l'apparition des autres pigments :

— La nature de l'aminoacide mis en œuvre permet de classer ces produits en deux groupes : ceux qui ne possèdent pas d'autre fonction aminée réactive dans leur molécule que le groupement acide α-aminé (aminoacides « simples ») et ceux dont la chaîne carbonée supporte d'autres groupements réactionnels (aminoacides « complexes »).

— Le *p*H auquel s'effectue la réaction entre la tricétone et l'aminoacide.

B. — Réaction de la ninhydrine avec les aminoacides « simples »

A la sortie du bain-marie, nous avons noté les colorations suivantes :

Aminoacide	Réaction effectuée à *p*H		
	5	7	8
Glycocolle, alanine, leucine, valine, ac. aspartique, sérine, thréonine.	violet	jaune orangé	jaune orangé
β-alanine	incolore	jaune orangé	rougeâtre
Phénylalanine	violet	brun rouge	jaune orangé
Méthionine	brun rouge	brun rouge	rouge brun

Malgré ces légères différences de coloration, les chromatogrammes obtenus avec ces différents aminoacides se sont montrés très comparables :

— Lorsque la réaction a été effectuée à *p*H = 5, on ne note que le spot coloré de la DYDA-NH_4 (sauf avec la β-alanine) ;

— En milieu neutre, on retrouve le spot précédent, mais accompagné d'un spot jaune de Rf inférieur (Rf = 0,03) ;

— En milieu alcalin, les deux spots observés en milieu neutre sont accompagnés d'un troisième coloré en jaune (Rf = 0,10) lorsque l'aminoacide est constitué par la sérine ou par la thréonine.

Nous n'avons pas identifié les colorants jaunes qui prennent naissance en milieu neutre ou légèrement alcalin. Remarquons toutefois que l'épuisement, par le *n*-butanol, du milieu aqueux où l'on a effectué la réaction ninhydrine-alanine par exemple, permet d'extraire dans la phase butanolique le pourpre de Ruhemann; la solution aqueuse reste alors colorée en jaune et la chromatographie de ce pigment nous a montré son identité avec le produit jaune décrit ci-dessus.

Rappelons à ce sujet que Polonovski et Moreno-Martín [358, 360], étudiant la réaction colorée de la ninhydrine avec les aminoacides en présence de sulfate d'ammonium, ont aussi noté l'existence d'un colorant jaune photosensibilisateur.

C. — Réaction de la ninhydrine avec les aminoacides « complexes »

Un certain nombre d'acides aminés réagissent avec la ninhydrine en donnant d'autres spots que les composés précédemment examinés. Les chromatogrammes obtenus apparaissent souvent très complexes et les pigments mal séparés. Aussi ne mentionnerons-nous dans le tableau ci-dessous que les spots colorés, bien visibles, obtenus avec trois diaminomonoacides et dont nous espérons pouvoir effectuer ultérieurement l'identification.

Aminoacide	Couleur des spots		
	Réaction à *p*H = 5	Réaction à *p*H = 7	Réaction à *p*H = 8
Ornithine, 2 HCl	bleu (fluorescence rouge), Rf = 0,14	orangé, Rf = 0,05 jaune, Rf = 0,24	»
Citrulline	»	rose, Rf = 0,01	rose, Rf = 0,01
Lysine, 2 HCl	orangé, Rf = 0,65	rose vif, Rf = 0,07 rose vif, Rf = 0,20	rose vif, Rf = 0,01 rose vif, Rf = 0,11

II. — RÉACTION NINHYDRINE-AMINOACIDES EN PRÉSENCE D'ÉTHANOL

Nous avons longuement insisté sur la cinétique différente de la réaction ninhydrine-aminoacides en milieu riche en solvant organique. L'expérience décrite ci-dessous nous montre qu'en plus de la vitesse plus grande d'apparition de la DYDA, la réaction évolue qualitativement d'une manière différente à chaud.

Nous avons porté dix minutes au bain-marie à ébullition deux tubes munis d'un réfrigérant à reflux et contenant les mélanges suivants :

Tube I. . { Ninhydrine ..... 2 mM
Alanine ..... 1 mM
Eau ..... 30 ml.

Tube II. . { Ninhydrine ..... 2 mM
Alanine ..... 1 mM
Ethanol à 75° ..... 30 ml.

Après refroidissement, nous avons soumis 15 µl de chaque mélange à la chromatographie sur papier (phase solvante : *n*-butanol saturé d'eau; papier Schleicher et Schüll 2043 b).

Tandis que le liquide du tube I ne nous a fourni qu'un seul spot coloré, celui de la DYDA (Rf = 0,52), le mélange hydro-alcoolique, tube II, nous a montré deux spots supplémentaires :

— Un spot allongé, légèrement coloré en jaune, à fluorescence rose, de Rf = 0,73 et dont l'importance augmente lorsqu'on laisse vieillir le mélange;

— Un spot bleu pâle, bien circulaire, non visible en lumière ultraviolette, de Rf = 0,83.

Ces modifications ne s'observent pas si la réaction en milieu hydro-éthanolique est effectuée à la température du laboratoire. Le spot bleu pâle apparaît également si l'on remplace, dans l'expérience précédente, la ninhydrine par l'hydrindantine. Il ne s'agit pas d'un produit de transformation de la DYDA en milieu alcoolique, car le chauffage du pourpre de Ruhemann dans ces conditions ne donne naissance qu'au spot jaune à fluorescence rose de Rf = 0,73.

Le spot bleu pâle est facilement éluable du papier par l'alcool absolu. Nous donnons ci-dessous le spectre d'absorption de ce pigment bleu dans ce dernier solvant.

Ce spot bleu n'est pas spécifique de l'alanine : nous avons noté son apparition avec le glycocolle, la leucine, la sérine, la valine et l'acide aspartique.

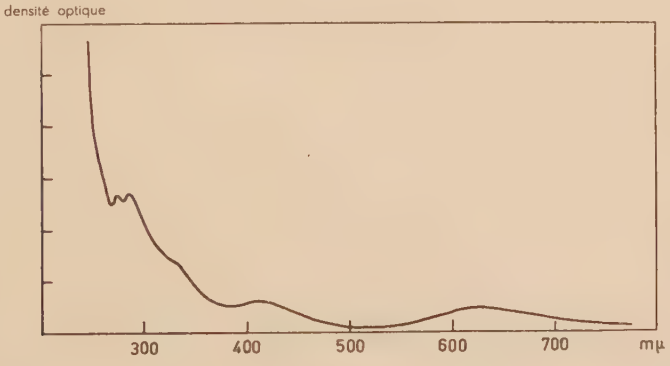


Fig. 48.

Spectre d'absorption du pigment bleu pâle de Rf = 0,83 dans l'alcool absolu.

III. — IDENTIFICATION DES ALDÉHYDES QUI ONT PRIS NAISSANCE AU COURS DE LA RÉACTION NINHYDRINE-AMINOACIDES

Dans la partie théorique de ce travail (voir p. 63), nous avons signalé que différents auteurs avaient basé des techniques de dosage des aminoacides sur la détermination de la quantité d'aldéhyde libérée au cours de la dégradation de Strecker.

Certains aminoacides, bien que de constitution chimique différente, possèdent le même coefficient de partage vis-à-vis de phases liquides partiellement miscibles et, de ce fait, ne peuvent être séparés avec commodité par la technique de chromatographie sur papier : c'est le cas du glycocolle et de l'alanine, de la leucine et de l'isoleucine, etc. Ces difficultés, depuis la période qui a immédiatement suivi la deuxième guerre, se sont d'ailleurs considérablement estompées car les perfectionnements successifs apportés à la composition des phases solvantes ont permis de mettre au point des systèmes particuliers rendant possible la séparation de ces couples d'analyse antérieurement difficile.

Quoi qu'il en soit, on peut aborder le problème d'une autre manière, en mettant en évidence par la chromatographie l'aldéhyde libéré. Il ne saurait être question de mettre en évidence sur les chromatogrammes les aldéhydes correspondant à la totalité des aminoacides, car la plupart de ces composés carbonylés s'avèrent très volatils et quittent le support cellulosique au cours du développement et du séchage du chromatogramme.

Dès 1947, Turba, en collaboration avec Schrader-Beielstein [471], a soumis à la chromatographie, sous la forme de leurs dinitro-2,4-phénylhydrazones, les aldéhydes entraînables par la vapeur après action de la ninhydrine sur les aminoacides; la séparation sur colonne de carbonate de zinc s'est révélée assez grossière, comme celle réalisée plus récemment, sur papier, par Leismann et Turba [265] : ces deux auteurs n'arrivent pas à séparer les aldéhydes correspondant à la leucine et à l'isoleucine, pas plus que ceux dérivant de la méthionine et de l'alanine.

En raison des difficultés particulières soulevées par la chromatographie des dinitro-2,4-phénylhydrazones, nous avons

voulu réaliser des essais en transformant les aldéhydes en d'autres dérivés.

Le réactif T de Girard, ou chlorure de triméthylacéthydrazide ammonium, pouvait être envisagé; mais les hydrazones qu'il fournit avec les divers aldéhydes dérivant des aminoacides, ont un comportement chromatographique trop similaire [424]. Aussi, nous avons reporté notre attention sur l'hydrazide de l'acide isonicotinique, dont la réactivité avec les composés carbonylés est bien connue (*).

Nous avons soumis à la chromatographie des solutions d'isoniazide à 1 p. 100 dans lesquelles nous avons introduit la quantité stoechiométrique des aldéhydes éthylique, *n*-propylique, *n*-butylique et isobutylique, c'est-à-dire les divers dérivés carbonylés correspondant à l'alanine, à l'acide α-aminobutyrique, à la norvaline et à la valine. Les chromatographies ont été réalisées sur papier Schleicher et Schüll 2043 b avec une phase solvante simplement constituée par une solution aqueuse de chlorure de sodium à 30 p. 1.000, milieu qui s'est révélé convenable pour la séparation de divers composés pyridiques [32]. Après séchage, le chromatogramme est introduit dans une enceinte close saturée de vapeurs de bromure de cyanogène (quinze minutes), puis d'ammoniac (cinq minutes); les spots sont nettement visibles en lumière ultraviolette. Les Rf obtenus sont les suivants :

	Rf
Isonicotinylhydrazidone de l'éthanal.....	0,85
Isonicotinylhydrazidone du *n*-propanal ...	0,85
Isonicotinylhydrazidone du *n*-butanal	0,80
Isonicotinylhydrazidone de l'isobutanal...	0,80
INH	0,75

La mauvaise séparation des aldéhydes nous a conduit à abandonner ces essais.

Section III

Etude microcristalloscopique de la réaction ninhydrine-aminoacides

L'étude chromatographique de la réaction ninhydrine-aminoacides décrite ci-dessus, bien que sommaire, nous a

(*) On consultera à ce sujet deux thèses effectuées dans notre laboratoire [423, 32].

montré que les aminoacides dont le groupement acide α-aminé constitue le seul groupement réactif, ont une action analogue sur la ninhydrine; les aminoacides « simples » s'opposent aux aminoacides « complexes » (voir p. 192) dont le diagramme chromatographique apparaît plus compliqué. L'étude microcristalloscopique nous a permis d'effectuer des constatations tout à fait superposables.

Nous avons laissé une heure au bain-marie à 37° C., et à l'obscurité, des solutions aqueuses renfermant différents aminoacides à la concentration de M/40 et une quantité stoechiométriquement triple de ninhydrine.

Les aminoacides examinés étaient les suivants :

— glycocolle,
— α-alanine,
— sérine,
— histidine (base),
— tryptophanne,
— arginine (base),
— citrulline,
— lysine (base),
— ornithine (base),
— cystéine (chlorhydrate).

Après une heure de séjour à 37° C., tous les liquides se montrent fortement colorés en bleu, sauf le mélange renfermant la cystéine qui est coloré en rouge. De plus, nous observons dans chaque tube un précipité assez abondant que nous avons examiné au microscope.

C'est l'aspect microcristalloscopique qui nous a permis de classer, ici encore, les aminoacides étudiés en deux groupes.

A. — Aminoacides « simples »

Le glycocolle, l'alanine, la sérine et la citrulline ont fourni les mêmes résultats microscopiques. Le précipité qui s'est insolubilisé au sein du liquide bleu renferme des éléments cristallins de deux types (fig. 49) :

1° Des cristaux incolores qui se présentent sous la forme de tables hexagonales, dont la forme est identique à celle des cristaux d'hydrindantine formée par réduction sulfhydrique de la ninhydrine. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau; leur dissolution en bleu dans des solutions diluées de soude confirme leur nature chimique;

2° Des cristaux rouges, en aiguilles souvent réunies en mâcles étoilées. Ces cristaux, également insolubles dans l'eau, se sont montrés identiques aux cristaux de bis-dicétoindanyle que nous avons préparés selon la technique de Moubasher, par action de l'acide sulfurique sur la ninhydrine.

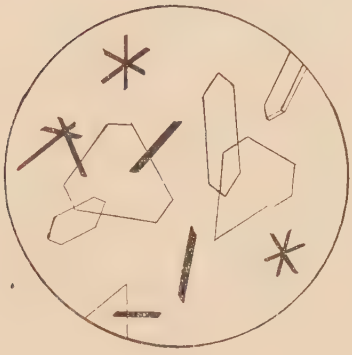


Fig. 49.

Aspect microcristalloscopique de la réaction ninhydrine-aminoacides « simples ».

Ces résultats, joints à la démonstration chromatographique antérieure de l'identité du colorant bleu avec le sel d'ammonium de la DYDA (voir p. 192), nous montrent la complexité d'action de la ninhydrine, puisque trois composés bis-indaniques différents ont pris naissance au cours d'une réaction effectuée cependant dans des conditions très douces, puisque la température n'a jamais dépassé la valeur de 37° C.

C'est cette température modérée qui semble également responsable du classement de la citrulline parmi les aminoacides « simples », alors que nous l'avions précédemment rangée dans le groupe des aminoacides « complexes », à la suite d'une réaction effectuée à la température de 100° C.

B. — Aminoacides « complexes »

Les autres aminoacides examinés fournissent une image microscopique très différente de celle fournie par les composés précédents.

1° L'histidine, l'ornithine et la lysine donnent toutes trois un précipité composé de deux éléments, dont l'aspect cristallin n'est pas très net :

— Des granules très fortement colorés, noirs ou bleu foncé;

— Et un précipité rose.

2° Le tryptophanne donne naissance, dans nos conditions opératoires, à de magnifiques cristallisations brunes, groupées en oursins ou en branches de genêt (fig. 50).

Fig. 50.

Aspect microcristalloscopique
de la réaction ninhydrine-
tryptophanne.

3° Le précipité recueilli dans le tube contenant l'arginine, se présente sous la forme de longues chaînettes provenant de l'agglomération de granules de coloration bleue.

4° Le chlorhydrate de cystéine, après action de la ninhydrine, est transformé en un précipité blanc nettement cristallin (fig. 51) qui est vraisemblablement constitué par le composé décrit par Kuhn et Hammer [249].

Fig. 51.

Aspect microcristalloscopique
de la réaction ninhydrine-cystéine.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons consacré ce chapitre à différents aspects de la réaction ninhydrine-aminoacides.

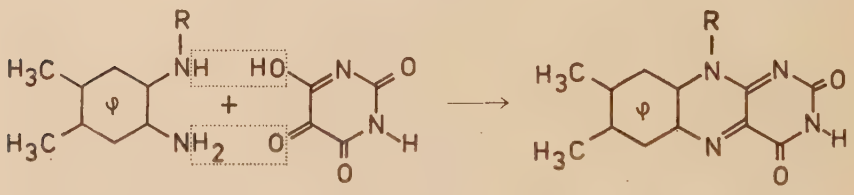
Dans notre première section, nous avons examiné la cinétique de formation de la DYDA en présence de différents alcools qui, tous, favorisent l'apparition du pigment bleu; le plus actif d'entre eux, l'alcool butylique tertiaire, a fait l'objet d'une étude particulière. Après avoir précisé le rôle des différents paramètres gouvernant la réaction, nous avons discuté nos résultats expérimentaux. L'action favorisante du méthyl-2-propanol-2, comme d'ailleurs celle des autres alcools, est liée, au moins partiellement, à la baisse de la constante diélectrique du milieu réactionnel; cette baisse permet la transformation de l'ion bipolaire inactif de l'aminoacide (zwitterion) en une forme électriquement neutre, capable de réagir plus facilement avec la ninhydrine. La présence d'alcool butylique tertiaire dans le milieu réactionnel permet d'effectuer une étude comparée, à la température ambiante, de la réactivité des différents aminoacides avec la ninhydrine. Un certain nombre de règles ont pu être ainsi formulées. Des substances dérivées des aminoacides et divers produits d'intérêt biologique ont également fait l'objet de nos investigations.

Les deux dernières sections du chapitre III renferment quelques essais d'analyse de la réaction ninhydrine-aminoacides au moyen de la chromatographie de partage sur papier et de l'examen microcristalloscopique. Ces expériences ont permis de classer les aminoacides en deux groupes : ceux qui ne possèdent que le seul groupement acide α-aminé donnent lieu à une réaction au cours de laquelle, outre la DYDA, de l'hydrindantine et de la bis-dicétoindanyle prennent naissance; ceux dont la chaîne carbonée possède d'autres groupements réactionnels donnent lieu à des réactions plus complexes.

CHAPITRE IV

SELS D'INDANOQUINOXALINIUM APPARENTÉS A LA RIBOFLAVINE

L'une des méthodes les plus simples pour effectuer la synthèse de la vitamine B_2 consiste à condenser en milieu acide l'alloxanne avec une orthophénylènediamine convenablement substituée, le (D-ribityl-1')-amino-6-diméthyl-3,4-amino-1-benzène, selon la réaction suivante :



(D-ribityl-1')-amino-6-diméthyl-3,4-amino-1-benzène.

Alloxanne (forme lactime).

Riboflavine R = (D-ribityl-1')-

Il nous a semblé possible de remplacer dans cette réaction l'alloxanne par la ninhydrine, les deux substances possédant trois fonctions cétoniques vicinales qui leur confèrent des similitudes réactionnelles sur lesquelles nous avons déjà insisté (voir p. 40). Nous avons d'ailleurs déjà signalé que l'hydrate de tricétohydrindène réagit facilement avec l'*o*-phénylènediamine pour donner une quinoxaline, comme l'avait noté Ruhemann dès 1910 [387].

Ces essais nous ont paru intéressants, *a priori*, pour les deux raisons suivantes :

— Green et Delaby [170] ont décrit récemment des

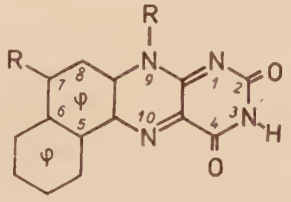
analogues quinoxaliniques d'une autre vitamine hydrosoluble, la thiamine;

— Tandis que les organiciens ont effectué la synthèse de très nombreuses substances apparentées à la riboflavine possédant encore la structure tricyclique de l'isoalloxazine (*), on ne trouve dans la littérature qu'un nombre fort réduit de produits voisins de la vitamine B_2, mais différant du composé naturel par la nature des cycles constitutifs.

I. — ANALOGUES DE LA RIBOFLAVINE RENFERMANT D'AUTRES CYCLES

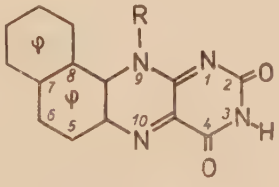
L'adjonction d'un quatrième cycle au noyau de l'isoalloxazine conduit aux séries :

— Des benzo-5,6-isoalloxazines, de formule générale :



Certaines ont donné lieu à d'intéressantes recherches biologiques. La phényl-9-benzo-5,6-isoalloxazine [268, 384] augmente la survie de souris inoculées avec du liquide d'ascite cancéreuse [267] ; injectée en solution huileuse par voie parentérale, elle présente la curieuse propriété de colorer en jaune la fourrure du Rat blanc [178] ; cette flavine a permis ainsi d'apporter d'intéressantes précisions sur la pousse des poils [177].

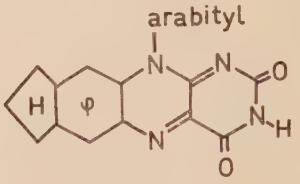
— Des benzo-7,8-isoalloxazines, dont les deux exemples ci-dessous ont été décrits par M. E. Fernholz et H. Fernholz [141].



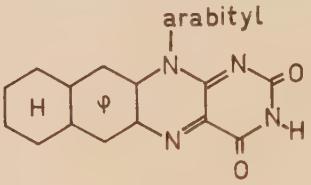
R = CH_3 ou C_2H_5

(*) Ces substances ont fait l'objet d'une revue générale récente [324].

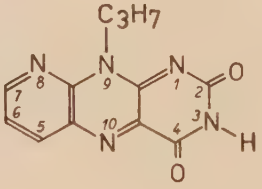
— De la triméthylène-6,7-isoalloxazine [252] :



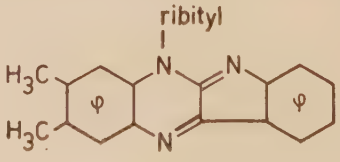
— De la tétraméthylène-6,7-isoalloxazine [252] :



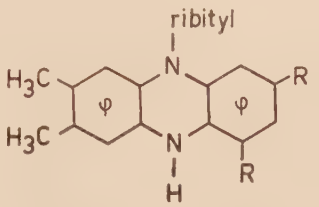
La substitution d'un cycle pyridinique au noyau benzénique d'une isoalloxazine conduit aux azaflavines; la propyl-9-aza-8-flavine préparée par Rudy et Majer [385], présente de multiples ressemblances physicochimiques avec les flavines naturelles :



Nous n'avons trouvé dans la littérature mention que de deux composés synthétisés dans le but de remplacer le cycle pyrimidinique d'une flavine par un cycle d'une autre nature. En 1938, Bednarczyk et Marchlewski [34] ont décrit une pseudoindophénazine ou indoloquinoxaline obtenue par l'union du (D-ribityl-1')-amino-6-diméthyl-3,4-amino-1-benzène avec l'isatine :



Les chimistes polonais ne fournissent aucune indication sur les propriétés vitaminiques de leur produit. Six ans plus tard, Woolley [519] synthétisait deux phénazines, la dinitro-2,4-diméthyl-7,8-(D-ribityl-1')-10-dihydro-5,10-phénazine et son produit de réduction, la diamine-2,4 correspondante; ces deux produits manifestent une forte action antivitaminique, chez les bactéries comme chez la Souris [519, 401].



R = NO_2 ou NH_2

II. — PRÉPARATION DES SELS D'INDANOQUINOXALINIUM (*)

A. — Acéto-chlorure

Ce composé a été synthétisé en faisant réagir, dans l'acide acétique bouillant, le chlorhydrate du (D-ribityl-1')-amino-6-diméthyl-3,4-amino-1-benzène sur une quantité stoechiométrique de ninhydrine, en présence d'acide borique : Kuhn et Weygand [253] ont en effet attiré l'attention sur l'action favorisante de cet acide minéral dans la préparation des flavines.

Dès le mélange des solutions acétiques de la diamine et de ninhydrine, on observe l'apparition d'une coloration rouge à reflets jaunes; par refroidissement, un précipité orangé apparaît, constitué de petites aiguilles lancéolées; l'analyse élémentaire, effectuée sur le produit recristallisé dans l'acide acétique (rendement global de 50 %) et séché sous vide en présence de potasse, montre qu'il s'agit d'un acéto-chlorure de (D-ribityl-1')-1-diméthyl-6,7-(dihydroxy-3'-indano-1',2')-2,3-quinoxalinium (E I); dans ce produit, le groupement cétonique de la ninhydrine qui n'a pas pris part à la formation du cycle pyrazinique a conservé une molécule d'eau d'hydratation. Le point de fusion de ce composé et celui des dérivés ci-dessous ont été

(*) Une communication préliminaire a été présentée au IIIe Congrès international de biochimie, Bruxelles, août 1955 [323].

déterminés à l'aide du microscope à platine chauffante de Kofler.

Analyse :

E I, $C_{22}H_{25}O_6N_2Cl$, CH_3COOH (PM = 508,9; F = 188° C., déc.).

	% C	% H	% N	% Cl
Calculé	56,63	5,74	5,50	6,96
Trouvé	56,69	5,81	4,96	6,98
	56,88	5,72	5,38	6,99

Lorsque la réaction est conduite dans l'acide acétique froid, en l'absence d'acide borique, le rendement est plus faible; le produit obtenu, l'acétochlorure de (D-ribityl-1')-1-diméthyl-6,7-(oxo-3'-indano-1',2')-2,3-quinoxalinium (E II) diffère du composé précédent par l'absence d'hydratation de sa fonction cétonique libre. On peut encore appeler ce produit l'acétochlorure de (D-ribityl-1')-1-diméthyl-6,7-benzoylène-2,3-quinoxalinium.

Analyse :

E II, $C_{22}H_{23}O_5N_2Cl$, CH_3COOH (PM = 490,9).

	% C	% H	% N
Calculé	58,71	5,54	5,70
Trouvé	58,15	5,63	5,88
	57,94	5,89	5,64

B. — Chlorure

Il est également possible d'effectuer la condensation en milieu chlorhydrique 2 N; dans ces conditions, c'est le chlorure de (D-ribityl-1')-1-diméthyl-6,7-(oxo-3'-indano-1',2')-2,3-quinoxalinium qui précipite sous la forme de petits octaèdres brun orangé, que l'on recristallise dans HCl 2 N (E III).

Analyse :

E III, $C_{22}H_{23}O_5N_2Cl$ (PM = 430,5; F = 168° C., déc.).

	% N	% Cl
Calculé	6,50	8,24
Trouvé	6,11	8,71

Des cristaux de forme et de point de fusion identiques prennent également naissance par action du chlorhydrate

de (D-ribityl-1')-amino-6-diméthyl-3,4-amino-1-benzène sur la ninhydrine en solution alcoolique.

III. — PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES DES SELS D'INDANOQUINOXALINIUM

Les sels d'indanoquinoxalinium décrits ci-dessus se montrent très solubles dans l'eau (*), l'éthanol et le méthanol, solubles à chaud dans l'acide acétique et dans l'acide chlorhydrique 2 N, peu solubles dans l'acétate d'éthyle, l'éther, le chloroforme et le benzène. Les solutions aqueuses, colorées en jaune, présentent une fluorescence jaune-vert en lumière ultraviolette; ces solutions se montrent assez acides (pH = 3,5 pour E I); par addition de soude, elles passent progressivement au rouge tandis que la fluorescence disparaît; le changement de coloration est réversible et peut être observé successivement à plusieurs reprises. Sur la figure 52, nous avons représenté la courbe d'électrotitration du produit E I; l'inflexion constatée au voisinage de pH = 4,65 correspond d'une manière satisfaisante au pK$_a$ de l'acide acétique (K$_a$ = 1,75.10^{-5}), ce qui confirme la présence d'acide acétique dans la molécule.

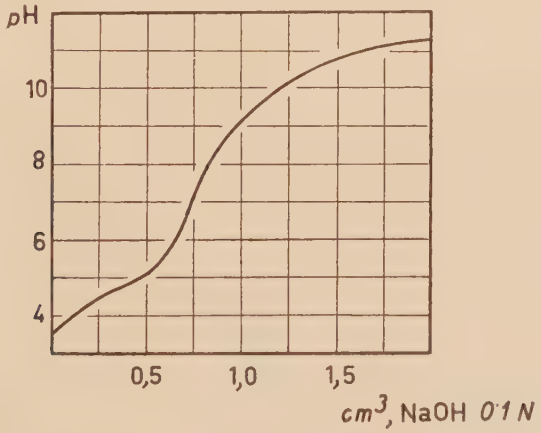


Fig. 52.

Courbe d'électrotitration du produit E I (10 cm^3 d'une solution à 4,4 μM/ml).

(*) Le chlorure E III est toutefois moins soluble dans l'eau que les deux autres sels.

La neutralisation puis l'alcalinisation des solutions aqueuses entraînent d'importantes modifications du spectre d'absorption; les courbes d'absorption de l'acétochlorure E I, déterminées en solutions acide (HCl N/10) et basique (NaOH N/10), sont consignées sur le graphique de la figure 53.

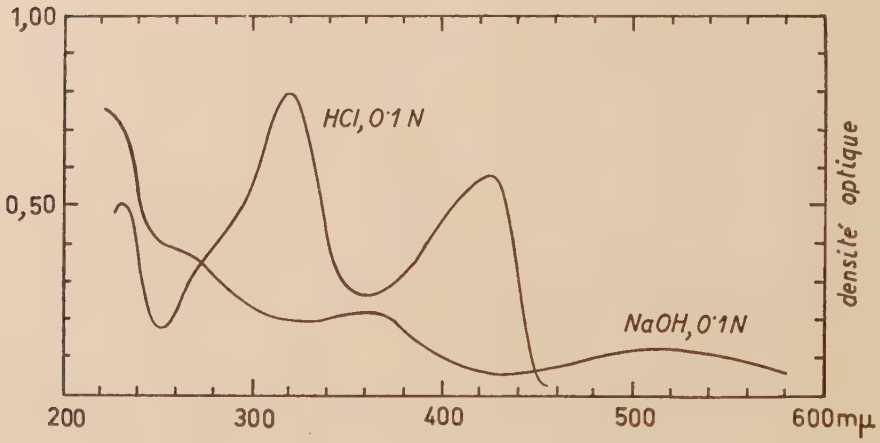


FIG. 53.

Spectre d'absorption de l'acétochlorure d'indanoquinoxalinium (E I), en milieu acide et en milieu alcalin. (0,03 μM/ml; épaisseur de cuve : 1 cm.)

On notera que les accidents observés en milieu acide (maxima pour 232, 320 et 425 mμ, minima pour 254 et 360 mμ) correspondent à ceux relevés en milieu alcalin (inflexion pour 257 mμ, maxima pour 360 et 515 mμ, minima pour 325 et 425 mμ); le spectre d'absorption apparaît donc bien différent de celui de la riboflavine, dont les maxima d'absorption, relativement peu influencés par les variations de *p*H, s'observent pour les valeurs de 221-223, 266-268, 359-372 et 445-475 mμ [248, 250]; la pseudoindophénazine décrite par BEDNARCZYK et MARCHLEWSKI [34], dont le noyau ne diffère de E I que par le remplacement du groupement carbonylé hydraté par un atome d'azote, présente en solution alcoolique les caractéristiques spectroscopiques suivantes :

Maxima = 276, 376 mμ,
Minima = 241, 310, 412 mμ.

Les solutions aqueuses des sels d'indanoquinoxalinium s'altèrent lorsqu'on les conserve à l'air et à la lumière : on

note l'apparition, au voisinage de la surface, d'une coloration verte qui s'étend progressivement à l'ensemble du liquide; aussi avons-nous pris soin d'effectuer les préparations décrites ci-dessus à l'obscurité et sous courant d'azote.

Nous avons effectué l'étude chromatographique des sels E I, E II et E III; leur comportement est identique avec les phases solvantes que nous avons utilisées; les trois produits donnent un spot jaune, à fluorescence jaune, qui vire au rose après pulvérisation du chromatogramme avec de l'alcool ammoniacal, tandis que sa fluorescence disparaît. Les Rf notés sont les suivants (papier Schleicher et Schüll n° 2043 b; spots de 2,5 μl d'une solution aqueuse à 0,5 p. 100; t = 25° C.) :

Phase solvante	Rf
Butanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5)	0,38
Butanol saturé d'eau	0,43
Butanol/*n*-propanol/eau (2 : 2 : 1)	0,58
Acétate d'éthyle/pyridine/eau (2 : 1 : 2).....	0,98
Phénol saturé d'eau	0,99

Lorsque les chromatogrammes sont réalisés avec des produits altérés, on note que le spot jaune est précédé d'une très légère traînée rougeâtre, à peine visible en lumière ordinaire et faiblement fluorescente en lumière ultraviolette, et qu'il est suivi d'un spot vert non fluorescent.

IV. — STRUCTURE DES PRODUITS OBTENUS

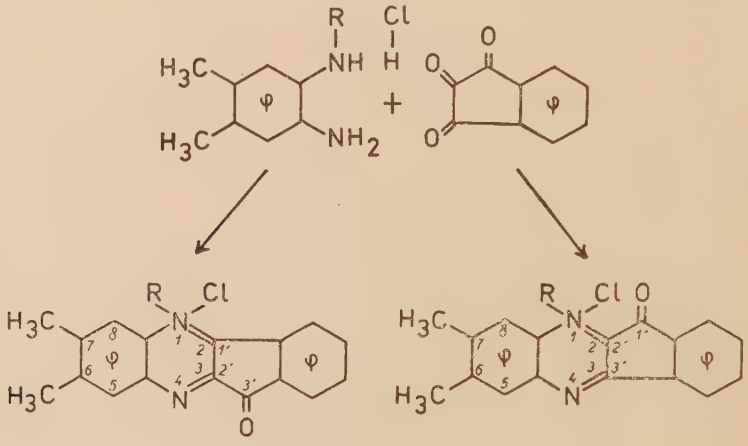
Les trois sels E I, E II et E III fournissent quelques réactions caractéristiques de la quinoxaline. L'acide sulfurique concentré les dissout tandis qu'une coloration rouge foncé apparaît; la dilution ultérieure avec de l'eau distillée fait virer cette coloration au jaune.

La réduction par l'hydrosulfite de sodium, en milieu neutre ou légèrement alcalin, conduit à la formation d'un précipité vert floconneux non fluorescent. En présence d'acide chlorhydrique concentré, le chlorure stanneux ou le zinc donne une coloration rouge; cette réaction des quinoxalines s'observe également avec la riboflavine, par suite de la formation de rhodoflavine [297, 251].

Les solutions aqueuses des sels d'indanoquinoxalinium, chauffées avec des aminoacides, ne fournissent aucune coloration bleue : il n'y a donc pas d'hydrolyse avec libération de ninhydrine, même à la température de l'ébullition.

Nous avons signalé plus haut le changement de coloration réversible entraîné par les modifications du *p*H; l'action de la soude apparaît fort complexe, car les solutions aqueuses de nos produits cèdent aux solvants organiques (chloroforme, éther) une substance orangée à fluorescence rose saumon; ces mêmes solutions aqueuses alcalines laissent déposer, après quelques heures, un précipité rougeâtre non fluorescent.

La condensation de l'indanetrione avec une *o*-phénylènediamine N-substituée laisse prévoir l'existence de deux composés isomères :

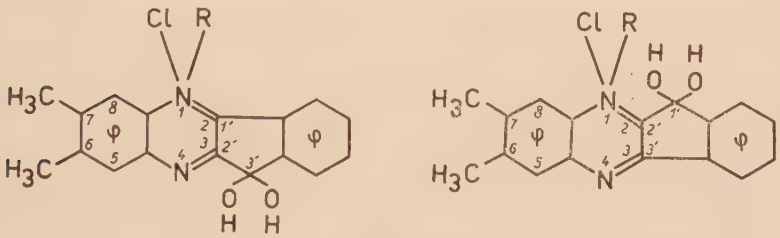


R = (D-ribityl-1').

Nous n'avons pu encore établir si nos produits correspondent à l'un de ces deux composés, ou à un mélange; nous penchons cependant en faveur de cette deuxième hypothèse, car l'action d'une solution saturée d'acide picrique sur les solutions aqueuses de nos produits permet de séparer deux types de cristaux différents : les uns, solubles dans l'eau chaude et colorés en orangé, fondent à 112° C.; les autres, de couleur brun-jaune à reflets métalliques, sont très peu solubles (F = 174° C.).

L'obtention d'un composé à fonction cétonique hydratée (E I) en présence d'acide borique semble être en rapport avec le pouvoir que possède la ninhydrine de donner, précisément au niveau de son groupement $\diagdown C \langle^{OH}_{OH}$, des complexes avec

l'acide borique [493]. Pour la forme hydratée, on peut admettre également l'existence des deux structures suivantes :



R = (D-ribityl-1').

V. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

Afin de savoir si les sels d'indanoquinoxalinium possèdent des propriétés antagonistes vis-à-vis de la vitamine B_2, nous avons étudié leur action sur certains germes. Nos essais ont été réalisés avec une solution aqueuse du produit E I, tyndallisée à l'abri de la lumière.

Une première expérience (*) a été effectuée avec un germe capable de se développer en l'absence de riboflavine, *Eberthella typhosa;* l'adjonction de l'acétochlorure au bouillon peptoné n'exerce aucune influence sur la pousse de cette bactérie, même lorsque la concentration en sel d'indanoquinoxalinium atteint la valeur de 1 mg/cm³.

Une deuxième série d'essais a été entreprise avec un *Streptococcus fecalis* pathogène, dont la pousse nécessite la présence de vitamine B_2. En bouillon peptoné ordinaire, E I exerce une inhibition proportionnelle à sa concentration (tableaux XXXII A et XXXII B).

La riboflavine, à la concentration de 100 μg/cm³, s'oppose partiellement à l'effet du sel d'indanoquinoxalinium, comme le montre l'examen comparatif des tableaux XXXII A et XXXII B; on remarque en particulier qu'une teneur de 200 μg/cm³ du produit E I inhibe complètement la croissance du germe malgré la présence de 100 μg/cm³ de riboflavine, tout au moins dans les deux premiers jours de l'expérience.

Il semble donc que notre produit E I se comporte comme une antiriboflavine, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour pouvoir l'affirmer.

(*) Ces essais ont été réalisés par M. le docteur Darasse, de l'Institut Pasteur de Dakar, à qui nous exprimons notre gratitude.

TABLEAU XXXII A

INHIBITION DE LA POUSSE DE *S. fecalis* PAR L'ACÉTOCHLORURE D'INDANOQUINOXALINIUM (expérience en bouillon peptoné).

Concentration en E I (γ/cm^3)	temps d'observation (heures)					
	20	24	48	60	72	84
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
100	0	++	+++	+++	+++	+++
150	0	0	0	+++	+++	+++
200	0	0	0	0	0	0
500	0	0	0	0	0	0

TABLEAU XXXII B

INHIBITION DE LA POUSSE DE *S. fecalis* PAR L'ACÉTOCHLORURE D'INDANOQUINOXALINIUM (expérience en bouillon peptoné renfermant 100 μg/cm^3 de riboflavine).

Concentration en E I (γ/cm^3)	temps d'observation (heures)					
	20	24	48	60	72	84
0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
100	+	+++	+++	+++	+++	+++
150	0	0	+	+++	+++	+++
200	0	0	0	+	+++	+++
500	0	0	0	0	0	0

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Après avoir donné la liste des substances apparentées à la riboflavine dans lesquelles ont été introduites des modifications portant sur l'un ou plusieurs des cycles du noyau isoalloxazinique, nous avons décrit la synthèse de trois sels d'indanoquinoxalinium, l'acétochlorure de (D-ribityl-1')-1-diméthyl-6,7-(dihydroxy-3'-indano-1',2')-2,3-quinoxalinium, l'acétochlorure et le chlorure de (D-ribityl-1'-)-1-diméthyl-6,7-benzoylène-2,3-quinoxalinium. Des propriétés physicochimiques de ces trois nouveaux dérivés sont indiquées : solubilité, électrotitration, spectre d'absorption, caractéristiques chromatographiques. La structure chimique de ces produits a été discutée. Ces substances, inactives sur *E. typhosa*, inhibent au contraire la pousse d'un *Str. fecalis*, germe nécessitant la présence de riboflavine dans le milieu de culture; cette inhibition est partiellement levée par la vitamine B_2.

CHAPITRE V

HÉMOLYSE DES HÉMATIES TRAITÉES PAR LA NINHYDRINE

La multiplicité et la variété des agents chimiques ou physiques capables de provoquer l'hémolyse témoignent des nombreux mécanismes responsables de la désorganisation des constituants structuraux du globule rouge. Ces constituants sont assez bien connus, mais nos idées sur leur agencement réciproque, sur la morphologie inframicroscopique de l'hématie, ne dépassent pas encore le stade des hypothèses [155, 363, 97, 364]. Il nous a semblé intéressant de faire agir sur l'hématie des réactifs chimiques susceptibles d'apporter des modifications spécifiques et définies des constituants protidiques, puis d'étudier diverses propriétés physicochimiques ou physiologiques du globule rouge. Nous rapportons dans ce chapitre les particularités de l'hémolyse des hématies humaines traitées par la ninhydrine (*).

I. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES HÉMATIES

György et Rose [176] ont signalé que la ninhydrine, non hémolytique *in vitro*, produit au contraire une hémolyse intravasculaire rapide lorsqu'on l'injecte au Rat préalablement carencé en vitamine E. Nos essais ont porté sur des hématies humaines provenant de sujets sains appartenant à différents groupes sanguins.

Les globules rouges, soigneusement débarrassés des protéi-

(*) Ce travail a déjà fait l'objet d'une note [321].

nes plasmatiques par lavage, sont mis en suspension dans de l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7 et traités pendant trente minutes à 37° C. par des quantités variables de ninhydrine. Lorsque la concentration en ninhydrine dépasse une certaine valeur, correspondant à la mise en jeu de 7.10^{-6} μg ou plus d'indanetrione par hématie, le traitement entraîne une hémolyse importante. Notre attention s'est portée sur les concentrations inférieures qui, au contraire, n'entraînent ni hémolyse, ni modification morphologique des globules rouges; ces éléments, qui ont conservé leur forme biconcave, sont centrifugés et lavés à plusieurs reprises à l'eau physiologique pour débarrasser leur suspension de l'excès éventuel de réactif et des produits qui ont pris naissance au cours du traitement par la ninhydrine. On obtient, en définitive, une suspension d'hématies légèrement plus foncées que les hématies témoins. Cette coloration est à rapprocher de celle signalée par Robuschi [378] qui traite par l'alloxanne les hématies de Lapin.

Nous avons examiné le comportement vis-à-vis de deux types d'agents hémolytiques des globules rouges ainsi modifiés, comparativement à des hématies non traitées par la ninhydrine, mais ayant subi les mêmes manipulations.

II. — HÉMOLYSE DES HÉMATIES TRAITÉES PAR LA NINHYDRINE

A. — Hémolyse par hypotonie

Les hématies traitées présentent vis-à-vis des solutions hypotoniques une résistance nettement supérieure à celle des hématies natives : alors que ces dernières commencent à s'hémolyser pour une concentration en chlorure de sodium variant, selon les sujets, de 0,54 à 0,37 g p. 100 (valeur médiane : 0,47), les globules soumis à l'action de la ninhydrine ne manifestent un début d'hémolyse qu'à des concentrations comprises entre 0,36 et 0,18 g p. 100 (valeur médiane : 0,23). Nous avons rassemblé quelques exemples dans le tableau ci-après :

TABLEAU XXXIII

Seuils d'hémolyse osmotique
(exprimés en NaCl, g p. 100).

Sujets	Hématies natives	Hématies traitées
Mor.	0,40	0,27
Rob.	0,40	0,18
Ric.	0,45	0,27
Dol.	0,40	0,18
Boy.	0,50	0,36
Tat.	0,36	0,27
Lap.	0,45	0,20
Cau.	0,36	0,18
Hal.	0,45	0,27
Luc.	0,49	0,36
Cou.	0,45	0,18
Cor.	0,54	0,36

Cette différence concernant les seuils d'hémolyse se confirme par l'étude de la vitesse d'hémolyse : en présence d'une même solution hypotonique, la libération de l'hémoglobine s'effectue plus lentement quand les globules rouges ont été préalablement traités. Nous donnons à titre d'exemple le résultat d'une expérience.

Une suspension d'hématies traitées ($2{,}6.10^{-6}$ µg de ninhydrine par hématie) et une suspension d'hématies témoins sont placées dans une solution de chlorure de sodium hypotonique à 0,27 p. 100. A intervalles de temps réguliers, on prélève un même volume de ces suspensions globulaires, on centrifuge et on dose, dans le liquide surnageant, l'hémoglobine libérée au cours de l'hémolyse en la transformant en méthémoglobine par acidification. Ce dernier dérivé est évalué photométriquement (diffuso-absorptiomètre de Dognon). On étalonne au préalable l'appareil avec les mêmes suspensions globulaires mises en présence d'eau distillée pour obtenir la valeur de l'hémolyse maximum (100 p. 100).

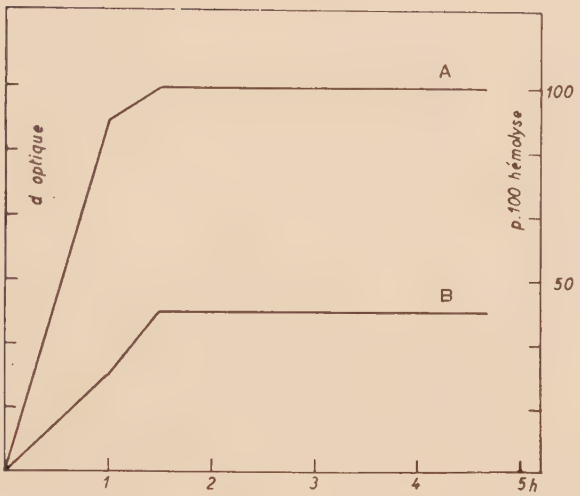


Fig. 54.

Hémolyse en fonction du temps.

A : hématies témoins;

B : hématies ninhydrinées.

La valeur de la résistance à l'hémolyse osmotique se montre en relation avec la quantité de ninhydrine mise en œuvre. Pour illustrer ce fait, nous groupons les résultats d'une des nombreuses expériences que nous avons effectuées dans le tableau XXXIV, ci-après.

Ces résultats nous montrent l'influence de la concentration en ninhydrine et l'existence d'une valeur privilégiée de $2{,}6.10^{-6}$ μg par hématie qui nous est apparue, dans tous les cas, la plus efficace.

Les résultats sont identiques quel que soit le groupe sanguin du sujet. Mais cette propriété de l'hématie « ninhydrinée » n'a pu être mise en évidence ni chez le Cheval, ni chez le Mouton : leurs hématies, traitées dans les mêmes conditions, manifestent la même sensibilité vis-à-vis de l'hémolyse par hypotonie que les hématies témoins.

Nous pensons que la ninhydrine augmente la résistance osmotique des globules rouges par son action thioloprive : la transformation des groupements — SH en ponts disulfure, en renforçant la cohésion des protéines fibrillaires situées à la surface de l'hématie, s'oppose à la rupture de la membrane globulaire.

TABLEAU XXXIV

HÉMOLYSE PAR HYPOTONIE D'HÉMATIES NORMALES ET NINHYDRINÉES.

Lecture des résultats au bout de vingt-quatre heures, les tubes étant restés à la température du laboratoire :

0 = pas d'hémolyse; ± = début d'hémolyse; + = hémolyse légère; + + = hémolyse particlle; + + + = hémolyse importante; + + + + = hémolyse totale.

CONCENTRATION EN ClNa (g p. 100)	HÉMATIES TÉMOINS	HÉMATIES TRAITÉES (quantité de ninhydrine en μg par hématie).					
		$2{,}6.10^{-6}$	4.10^{-6}	$5{,}3.10^{-6}$	$6{,}6.10^{-6}$	8.10^{-6}	$9{,}3.10^{-6}$
0,9	0	0	0	0	±	+	+ +
0,81	0	0	0	0	+ +	+ +	+ + +
0,72	0	0	0	0	+ +	+ +	+ + +
0,63	0	0	0	0	+ +	+ +	+ + +
0,54	0	0	0	0	+ +	+ +	+ + +
0,45	+ +	0	±	±	+ + +	+ + +	+ + + +
0,35	+ + + +	0	+	+	+ + + +	+ + + +	+ + + +
0,27	+ + + +	±	+	+ +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
0,18	+ + + +	+	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
0,09	+ + + +	+ + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +
0	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +

Différents auteurs ont d'ailleurs insisté sur l'importance des groupements thiol dans le maintien de la structure de l'hématie [407, 467, 35]. Si notre interprétation est justifiée, il est probable que l'hématie traitée par la ninhydrine ne présentera

aucune résistance particulière vis-à-vis d'agents hémolytiques dont l'action porte sur des constituants non influencés par ce réactif. Nous avons étudié à ce sujet l'action de substances hémolytiques appartenant au groupe des agents superficiellement actifs.

B. — Hémolyse par les agents superficiellement actifs

Les agents superficiellement actifs ionisés se montrent de puissants agents hémolytiques; ils contribuent à permettre le départ de l'hémoglobine en formant avec les lipides de la membrane des associations moléculaires hydrosolubles [117]. Leur action sur les hématies humaines traitées par la quantité de ninhydrine qui s'est révélée précédemment la plus favorable est à peu près superposable à ce que l'on observe avec des hématies normales.

Avec un agent anionique, le laurylsulfate de sodium en solution dans de l'eau physiologique à 9 p. 1000, nous n'observons pas de résistance de l'hématie traitée. Voici un exemple obtenu avec des hématies humaines normales et traitées par de la ninhydrine à la concentration de $2{,}6.10^{-6}$ μg par hématie (tableau XXXV).

En présence d'un agent cationique, le bromure de β-phénoxyéthyldiméthyldodécylammonium, dans les mêmes

TABLEAU XXXV

Hémolyse par les agents superficiellement actifs.

Action du laurylsulfate de sodium sur les hématies normales et ninhydrinées.

	Lecture après	Laurylsulfate de sodium (solution en g/l)				
		0,071	0,062	0,055	0,050	0,040
Hématies témoins	30 mn	++++	++	++	0	0
	120 mn	++++	+++	+++	0	0
Hématies ninhydrinées	30 mn	++++	++++	++++	0	0
	120 mn	++++	++++	++++	0	0

conditions, on note une faible résistance temporaire (voir tableau XXXVI) nullement comparable à celle obtenue avec l'hémolyse hypotonique. Cette vitesse d'hémolyse légèrement inférieure semble due au fait que les ammoniums quaternaires à chaîne grasse agissent non seulement sur les constituants lipidiques, mais surtout sur les cénapses lipidoprotéidiques [353].

TABLEAU XXXVI

Hémolyse par les agents superficiellement actifs.

Action du bromure de β-phénoxyéthyldiméthyldodécylammonium sur les hématies normales et ninhydrinées.

	Lecture après	Bromure de β-phénoxyéthyldiméthyldodécylammonium (solution en g/l)				
		0,014	0,015	0,016	0,018	0,020
Hématies témoins	30 mn	0	++++	++++	++++	++++
	120 mn	++++	++++	++++	++++	++++
Hématies ninhydrinées	30 mn	0	0	+	+	++++
	120 mn	++++	++++	++++	++++	++++

Nous pensons orienter nos expériences ultérieures vers l'étude de l'hémolyse immunologique des hématies traitées par l'hydrate d'indanetrione.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

Certains aspects de l'action de la ninhydrine sur le globule rouge humain sont examinés dans ce chapitre.

Pour une concentration convenable qui est précisée, la ninhydrine ne manifeste pas de propriétés hémolytiques. Les globules traités par cette tricétone, légèrement colorés en brun, ont acquis des propriétés nouvelles et montrent une résistance importante à l'hémolyse par hypotonie. Cette propriété est indépendante du groupe sanguin, mais ne se retrouve ni avec les hématies du Cheval, ni avec celles du Mouton.

Le comportement des hématies humaines ninhydrinées vis-à-vis des agents superficiellement actifs, anioniques ou cationiques ne se montre, au contraire, nullement modifié. Ceci permet d'émettre l'hypothèse d'une action élective de la ninhydrine sur les groupements thiol des protéines de l'hématie, la création de ponts disulfure renforçant la cohésion des protéines superficielles et s'opposant ainsi à la rupture de la membrane globulaire.

CHAPITRE VI

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ ET DE QUELQUES PROPRIÉTÉS PHARMACODYNAMIQUES DE LA NINHYDRINE

Nous avons déjà signalé, dans notre première partie, que Ruhemann ne se contenta pas de synthétiser la ninhydrine et d'en étudier les principales propriétés chimiques : ce chimiste, prévoyant probablement des propriétés pharmacodynamiques accusées chez une substance si réactive, voulut connaître l'action de cette tricétone sur les organismes animaux ou végétaux. Les études initiales des biologistes allemands [276, 260] furent reprises après la découverte du diabète alloxannique, en raison de la similitude de structure des deux substances. Mais les auteurs qui se sont intéressés à ce problème ont simplement constaté la toxicité plus grande de la ninhydrine par rapport à celle de l'alloxanne et n'ont pas effectué d'investigation quantitative. C'est la raison pour laquelle nous avons précisé la toxicité de la tricétone afin de pouvoir donner des bases plus solides à d'éventuelles recherches pharmacodynamiques. Cette étude nous a conduit à examiner le mécanisme d'action de la toxicité en recherchant des substances capables de prévenir son action. Nous apportons enfin quelques expériences relatives aux propriétés pharmacodynamiques sur le Chien.

Nous envisagerons donc successivement :

— L'étude de la toxicité aiguë de la ninhydrine vis-à-vis de la Souris blanche;

— Son mécanisme d'action;

— L'étude de quelques propriétés pharmacodynamiques.

I. — TOXICITÉ AIGUË DE LA NINHYDRINE VIS-A-VIS DE LA SOURIS BLANCHE (*)

Nous n'avons trouvé dans la littérature aucune étude quantitative concernant la toxicité aiguë de la ninhydrine vis-à-vis des animaux de laboratoire. Aussi avons-nous cherché à établir la dose léthale moyenne (DL_{50}), c'est-à-dire la dose de ninhydrine qu'il faut injecter pour tuer 50 % des animaux testés. Cette dose peut être facilement déterminée par les méthodes statistiques, avec une grande précision.

Nous avons injecté la ninhydrine en solution dans de l'eau physiologique, par voie intrapéritonéale, à des souris blanches (**). Après l'injection, les animaux sont laissés en observation pendant vingt-quatre heures, sans boisson ni alimentation. La concentration de la solution injectée est calculée de telle sorte que la dose pour 10 g de souris soit contenue dans un volume de 0,25 ml. Le poids moyen des souris, mâles ou femelles, est de 27,5 g.

Nous groupons nos résultats expérimentaux dans le tableau XXXVII :

L'étude statistique de ces résultats par la méthode classique de la transformation en « probits », nous permet de calculer que la dose léthale moyenne, au bout de vingt-quatre heures, de la ninhydrine pour la Souris est de :

$$DL_{50} = 78 \pm 5 \text{ mg/kg.}$$

Les symptômes observés après l'injection varient suivant les doses administrées. A la dose de 250 mg/kg, par exemple, après une phase d'excitation, l'animal se couche rapidement sur le flanc, ne réagit plus aux excitations et meurt au bout de cinq à dix minutes, par asphyxie. La dose de 100 mg/kg entraîne un « pincement » lombaire avec parésie transitoire du train postérieur; puis l'animal se gratte au niveau du point d'injection; les souris présentent une légère excitation transitoire bientôt suivie d'un abattement profond; les animaux se groupent dans un coin de la cage, le poil hérissé, dyspnéiques, en état de vaso-dilatation cutanée. Enfin, avec des doses non mortelles, on note simplement, après une légère atteinte

(*) Ce travail a déjà fait l'objet d'une note [58].

(**) Ces souris proviennent de l'élevage de l'Institut Pasteur de Dakar, qui nous a très aimablement fourni ces animaux.

TABLEAU XXXVII

Toxicité aigue de la ninhydrine vis-a-vis de la Souris blanche (injection intrapéritonéale).

Ninhydrine (mg/kg)	Nombre d'animaux utilisés	Pourcentage de mortalité au bout de 24 h.	Valeur du « probit »
500	10	100	»
250	10	100	»
200	25	96	6,7
175	25	96	6,7
150	25	100	»
125	25	92	6,4
100	25	84	6,0
75	25	56	5,1
50	25	20	4,1
25	25	4	3,2
12,5	6	0	»
6,25	6	0	»
0	25	0	»

parétique du train postérieur et le grattage au point d'injection, un état de somnolence.

L'autopsie montre, chez les seules souris ayant reçu les plus fortes doses de ninhydrine (500 mg/kg), une coloration bleue de la paroi et des organes abdominaux. Les autres animaux présentent des troubles vasculaires, allant d'une simple vaso-dilatation à de véritables hémorragies abdominales ou pulmonaires, troubles dont l'importance augmente en fonction de la quantité de produit injecté. L'étude histologique de ces lésions est actuellement en cours.

Nous avons réalisé quelques essais de toxicité en injectant la ninhydrine par voie intraveineuse chez la Souris (veine dorsale de la queue). Nos essais ne sont pas encore suffisamment nombreux en raison de la difficulté technique que soulève cette injection, pour que nous puissions donner ici la valeur de DL_{50} correspondant à cette voie. Il nous semble

cependant que la ninhydrine apparaît moins toxique par la voie intraveineuse que par la voie intrapéritonéale : en effet, plusieurs animaux qui ont reçu une dose de 100 mg/kg ont survécu plusieurs semaines, après avoir d'ailleurs présenté un amaigrissement important. Si ces résultats se confirment, il semble qu'on puisse les interpréter en admettant que la ninhydrine, lorsqu'elle est injectée directement dans le torrent circulatoire, rencontre une quantité importante de protéines et de protides divers qui la transforment rapidement en composés moins toxiques.

Notons à ce sujet que l'injection d'une solution de ninhydrine préalablement chauffée avec de l'alanine présente une toxicité considérablement diminuée. Ici aussi, nous ne pouvons encore fournir de résultats précis en raison du précipité qui prend naissance au cours de la réaction et qui soustrait ainsi une quantité importante des produits de la réaction sous la forme de substances insolubles.

II. — MÉCANISME DE L'ACTION TOXIQUE DE LA NINHYDRINE : ESSAIS DE PROTECTION PAR DIFFÉRENTES SUBSTANCES

Pour expliquer la forte toxicité de la ninhydrine, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

— Une action thioloprive,
— La réactivité des fonctions cétoniques,
— Une action hémorragique due :
  — à des modifications de la perméabilité capillaire,
  — à la libération d'histamine,
  — à des troubles de la coagulation.

Pour répondre à ces différentes hypothèses, nous avons étudié l'action protectrice éventuelle de plusieurs substances: elles sont injectées par voie intrapéritonéale, préalablement à l'injection de ninhydrine qui est effectuée après un temps t variable selon les différentes expériences.

A. — Essais de protection par les composés soufrés

L'action thioloprive de la ninhydrine, dont nous avons apporté nous-même deux nouveaux exemples (voir p. 109),

nous a conduit à étudier le pouvoir protecteur de trois dérivés soufrés :

— La cystéine,
— La cystéinamine,
— Le BAL (dimercapto-2,3-propanol-1) (*).

Nos résultats (tableau XXXVIII) montrent l'inefficacité totale de ces trois produits.

B. — Essais de protection par l'hydrazide de l'acide isonicotinique

En injectant un hydrazide, nous avons pensé pouvoir bloquer *in vivo,* sous la forme de l'isonicotinylhydrazidone que nous avons décrite, la fonction cétonique médiane de la ninhydrine, supprimant ainsi ses possibilités de réaction avec les protides.

La DL_{50} de l'hydrazide de l'acide isonicotinique par voie intrapéritonéale chez la Souris étant de 132 ± 13,2 mg/k [36] ; nous avons utilisé une dose de 100 mg/kg qui s'est montrée également complètement sans action (tableau XXXVIII).

C. — Essais de protection par des substances antihémorragiques

Frappé par l'importance des phénomènes de vaso-dilatation, de congestion et souvent même d'hémorragie observés d'une manière diffuse chez nos animaux d'expériences, nous avons pensé que le mécanisme de cette action pharmacologique pouvait être éclairci en examinant l'influence de substances actives, à divers titres, sur les phénomènes hémorragiques.

1° *Influence des substances réglant la perméabilité capillaire*

Nous avons étudié à ce sujet l'acide ascorbique et un facteur vitaminique P.

L'acide ascorbique, employé en solution physiologique neutralisée, augmente au contraire considérablement la toxicité de la ninhydrine, puisque, après une injection de 100 mg/kg de ce produit, suivie après trente minutes par l'injection intrapéritonéale de ninhydrine (100 mg/kg), on

(*) Produit qui nous a été aimablement envoyé par le Laboratoire Delalande, 16, rue Henri-Régnault, Courbevoie (Seine), que nous remercions ici.

TABLEAU XXXVIII

Toxicité aigue de la ninhydrine vis-a-vis de la Souris blanche. Essais de protection par différentes substances.

Substance utilisée		Ninhydrine		Nombre de souris traitées	Pourcentage de mortalité au bout de 24 h
Nom	Dose mg/kg	t minutes	Dose mg/kg		
	»	»	100	25	84
Cystéine (solution à *p*H 7).	100	»	»	25	4
	100	**15**	100	25	92
	100	**30**	100	25	96
Cystéinamine	150	»	»	25	12
	150	**30**	100	25	100
	100	»	»	25	4
	100	**30**	100	25	95
B. A. L.	50	»	»	25	4
	50	**90**	100	25	74
	25	»	»	25	0
	25	**30**	100	25	96
Hydrazide de l'acide isonicotinique	100	»	»	25	0
	100	**30**	100	25	95
Acide ascorbique	100	»	»	25	0
	100	**30**	100	25	100
Leucocyanidol	100	»	»	25	40
	100	**60**	100	25	100
	50	»	»	25	0
	50	**60**	100	25	88
Phénergan	50	»	»	25	4
	50	**30**	100	25	44
K-Thrombyl	50	»	»	25	0
	50	**30**	100	50	40
Naphtionate de sodium	100	»	»	25	0
	100	**30**	100	25	84

note 100 % de mortalité dès la septième heure. Cette constatation mérite d'être rapprochée des observations de Levey et Suter [269] concernant l'effet aggravant de l'acide ascorbique sur l'action diabétogène de l'alloxanne.

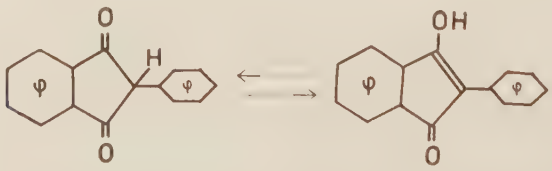
Nous avons utilisé comme facteur vitaminique P, en raison de l'hydrosolubilité de ce composé, le leucocyanidol de l'arachide (*), substance isolée en 1949 par Tayeau et Masquelier [458]. Non seulement le leucocyanidol ne nous a pas permis de protéger la Souris contre l'injection ultérieure de ninhydrine, mais encore cette substance s'est montrée relativement toxique pour cet animal (tableau XXXVIII).

2° *Influence d'un antihistaminique*

L'importance de la vaso-dilatation, l'existence de petites hémorragies diffuses peuvent faire penser que la ninhydrine joue le rôle d'une substance « histamino-libératrice ». Nous avons donc injecté, toujours par voie intrapéritonéale, le chlorhydrate de N-[(diméthylamino-2'-méthyl-2'-) éthyl]-phénothiazine ou phénergan (**) à la dose de 50 mg/kg. L'effet observé au bout de vingt-quatre heures (voir tableau XXXVIII) montre une nette diminution de mortalité; il s'agit plus, en réalité, d'effet retardateur que d'une véritable protection, car les souris qui ont survécu, remises dans des conditions normales d'alimentation et d'hydratation, meurent le jour suivant.

3° *Influence de substances actives sur la coagulation sanguine*

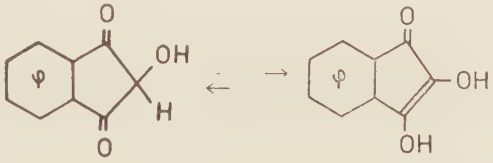
C'est tout d'abord à la vitamine K que nous avons pensé, en raison de l'analogie de structure entre la ninhydrine et certaines antivitamines K, notamment la phényl-2-indanedione-1,3. L'action antivitaminique K exige, selon Meunier [292], que la molécule puisse exister sous deux états tautomères céto-énoliques, ce qui est bien le cas de la phényl-2-indanedione-1,3 :



(*) Gracieusement fourni par les Laboratoires Oberlin, 17, rue Cadet, Paris (IX^e), et commercialisé en France sous le nom de Résivit.

(**) Ce produit nous a été aimablement fourni par M. le docteur Jean-Pierre, Directeur des Etablissements Spécia de Dakar, que nous remercions ici.

Cette même condition est réalisée avec le dérivé de réduction de la ninhydrine qui doit vraisemblablement prendre naissance *in vivo :*



Pour plus de commodités, nous avons employé comme facteur vitaminique K, un produit de synthèse, le sel de sodium de l'acide méthyl-2-naphtohydroquinone-dibenzoylsulfonique-1,4 ou K-Thrombyl (*). Ce produit s'est révélé être celui qui protège le mieux les souris traitées avec la ninhydrine : en effet, au bout de vingt-quatre heures, on note une mortalité de 40 p. 100 seulement (voir tableau XXXVIII), soit une diminution de 50 p. 100 environ par rapport aux témoins. Mais ici encore cette action ne semble pas durable : comme précédemment avec le phénergan, les animaux meurent le lendemain.

Le naphtionate de sodium, autre substance active sur la coagulation sanguine [135, 121], produit dépourvu d'action héparinique et pratiquement atoxique, s'est montré sans pouvoir protecteur (voir tableau XXXVIII).

III. — ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS PHARMACODYNAMIQUES CHEZ LE CHIEN

Nous rapportons ici quelques expériences dues à l'obligeance le M. le docteur Lemaire, maître de conférences agrégé, et réalisées dans son service de Physiologie de l'Ecole de médecine de Dakar.

L'étude de l'action pharmacodynamique fut effectuée chez le Chien chloralosé dans les conditions habituelles (0,10 g/kg). Nous exposerons tout d'abord les protocoles de trois expériences dans lesquelles les voies d'introduction de la ninhydrine ont été différentes. Au cours de ces essais, de nombreux enregistrements de pression, de tracés électrocardiographiques et pneumographiques ont pu être effectués simultanément grâce à l'appareil de Sanborn dont nous avons pu disposer.

(*) Nous remercions les Laboratoires Roussel, 89, rue du Cherche-Midi, Paris, qui nous ont fourni un échantillon de ce produit par l'intermédiaire de leur centre médical de Dakar.

Nous regrouperons ensuite ces résultats pour en effectuer l'analyse d'ensemble.

A. — Résultats expérimentaux

1° *Chien n° 1*

Le chien chloralosé a reçu une injection de ninhydrine à la dose de 5 mg/kg (solution physiologique à 2 p. 100), à l'intérieur des cavités cardiaques droites par l'intermédiaire

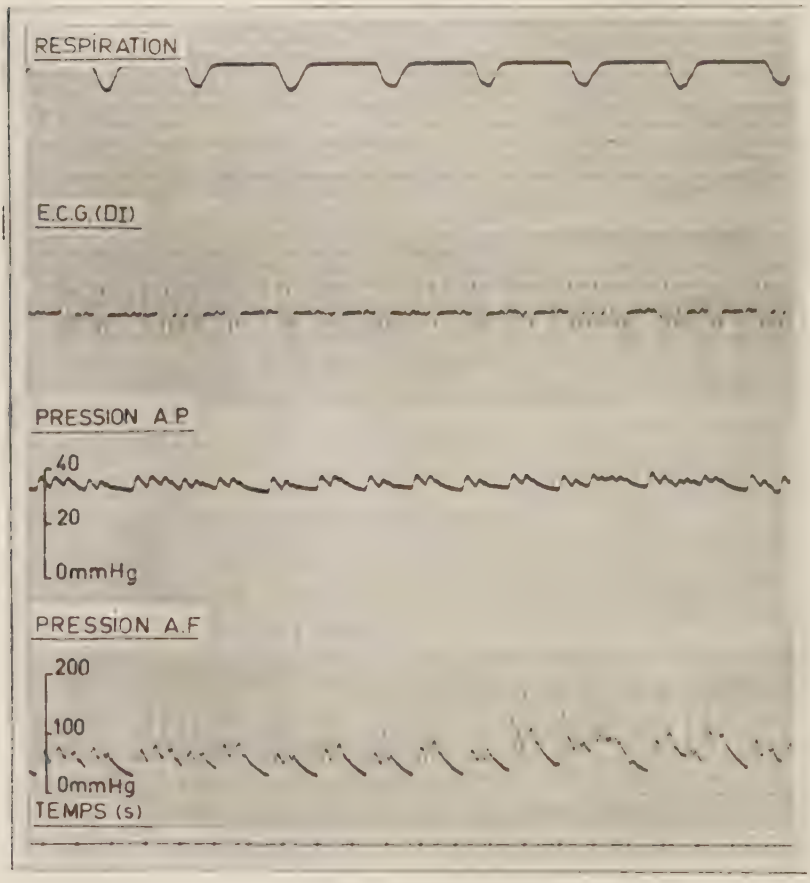


Fig. 55.

Enregistrement de la respiration, de l'E. C. G., des pressions dans l'artère pulmonaire (A. P.) et l'artère fémorale (A. F.) chez un chien ayant reçu une injection de ninhydrine dans les cavités cardiaques droites. (Pressions mesurées par électromanomètre; injection effectuée quatre-vingt secondes avant le tracé ci-dessus.)

d'un cathéter amené au voisinage de la région antrale de l'artère pulmonaire et dont la position est vérifiée par contrôle radiologique.

Les enregistrements de la pression au niveau de l'artère pulmonaire montrent une hypertension légère, tandis que la pression artérielle au niveau de l'artère fémorale montre des alternatives d'hyper- et d'hypotension. L'électrocardiogramme (D I) est très perturbé, montrant des extrasystoles en salves qui ont un retentissement sur la pression artérielle de la petite et de la grande circulation.

L'injection d'une dose moindre (2,5 mg/kg) de ninhydrine dans la cavité ventriculaire gauche se traduit par les mêmes effets sur l'électrocardiogramme et sur la pression artérielle avec une diminution de la pression intraventriculaire gauche. Ces troubles tensionnels et électrocardiographiques disparaissent après section des deux nerfs pneumogastriques.

2° *Chien n° 2*

Par une veine jugulaire, un cathéter est poussé dans la veine cave antérieure (*), et c'est à ce niveau qu'on injecte la tricétone (5 mg/kg).

Les mesures tensionnelles montrent alors une élévation immédiate de la pression veineuse, mesurée au niveau de la veine cave antérieure, et, au niveau de l'artère fémorale, une oscillation de la pression artérielle avec pincement de la différentielle. L'enregistrement de la respiration traduit une phase d'apnée précédée d'une brève polypnée intense (fig. 56).

L'injection poussée dans la veine fémorale nous a montré des effets physiologiques superposables.

3° *Chien n° 3*

Dans cette expérience, le sinus carotidien du chien fut dénudé et partiellement isolé (technique dite « du sinus en cul-de-sac ») par ligature des gros troncs, mais en respectant les petits vaisseaux efférents afin d'éviter une surpression qui viendrait perturber les résultats par action sur les récepteurs barosensibles.

L'injection de ninhydrine dans le sinus ainsi isolé est effectuée très lentement (4 mg/kg dilués dans un volume total de 20 ml d'eau physiologique). Elle se traduit immédiatement

(*) Equivalent de la veine cave supérieure de l'Homme.

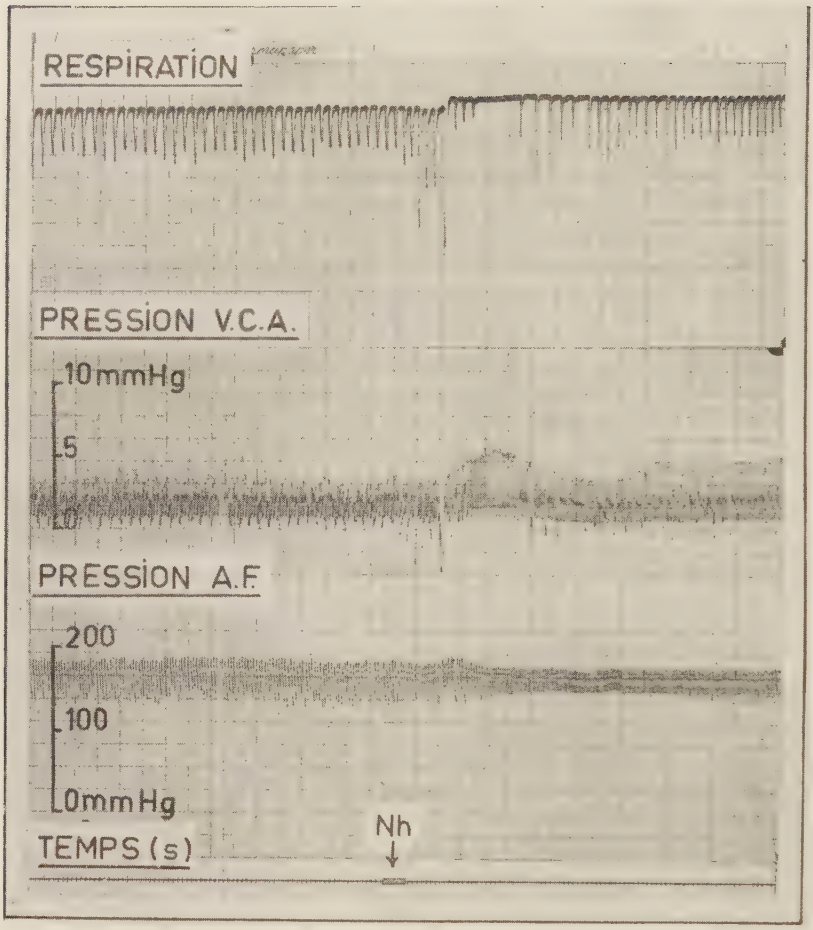


Fig. 56.

Enregistrement de la respiration et des pressions dans la veine cave antérieure (V. C. A.) et l'artère fémorale (A. F.) chez un chien ayant reçu une injection de ninhydrine dans la veine cave antérieure.

par une oscillation de la pression artérielle avec des extrasystoles et une polypnée suivie d'apnée (fig. 57).

Afin d'éliminer un effet éventuel sur les baropresseurs, une injection de 20 ml d'eau physiologique fut effectuée dans un temps comparable. Cette injection ne déclencha qu'une légère réaction d'hypotension.

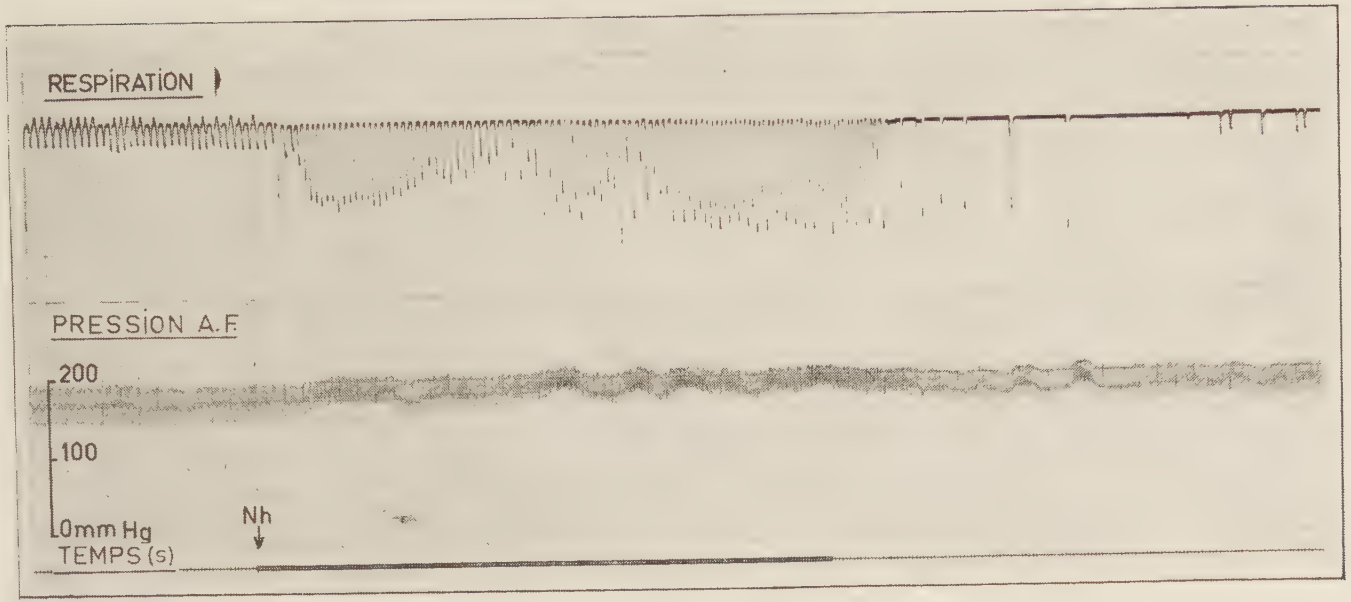


FIG. 57.

Enregistrement de la respiration et de la pression dans l'artère fémorale chez un chien ayant reçu une injection de ninhydrine dans le sinus carotidien.

B. — Analyse des résultats

Ces différentes voies d'introduction nuancent les résultats observés mais, dans l'ensemble, les réactions circulatoires, cardiaques et respiratoires sont superposables. Nous constatons en effet :

— Au point de vue respiratoire, l'apparition d'une phase d'apnée, précédée d'une phase de polypnée intense quoique de courte durée; cette phase d'apnée est suivie d'une reprise progressive du rythme respiratoire qui reste longtemps déprimé;

— Au point de vue cardiaque, on observe l'apparition de « bouffées » d'extrasystoles qui donnent au rythme cardiaque un aspect tachy-arythmique;

— Au point de vue tensionnel, on note la constitution d'une hypotension avec pincement de la différentielle, généralement précédée d'une courte phase d'hypertension. On enregistre, d'autre part, une légère hypertension dans l'artère pulmonaire avec élévation de la pression veineuse.

Le caractère immédiat de ces réactions respiratoires et circulatoires, qui apparaissent dès la fin de l'injection, évoque la possibilité d'une action sur la chimiosensibilité des vaisseaux avec origine réflexe d'un certain nombre des réactions observées. En effet, la ninhydrine injectée au contact des zones chimiosensibles de la bifurcation carotidienne, reproduit les réactions qui avaient suivi l'administration intraveineuse de cette substance. La section des nerfs pneumogastriques fait disparaître les phénomènes observés.

Ces résultats, loin de constituer une étude pharmacodynamique complète de l'action de la ninhydrine *in vivo*, montrent l'action intense de cette substance et un aspect nouveau des multiples propriétés de cette tricétone.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

Le dernier chapitre de notre travail est consacré à quelques essais biologiques effectués avec la ninhydrine.

Nous avons tout d'abord déterminé la DL_{50} de cette tricétone pour la Souris; injectée par voie intrapéritonéale, la dose léthale moyenne, au bout de vingt-quatre heures, est de 78 ± 5 mg/kg. Les symptômes varient selon les doses de

produit injectées, mais à l'autopsie on trouve des troubles vasculaires d'importance variable, allant de la simple vasodilatation à l'hémorragie. Des essais préliminaires semblent montrer que la ninhydrine s'avère moins toxique par la voie intraveineuse.

Pour interpréter la toxicité marquée de cette tricétone, nous avons injecté à l'animal différentes substances en vue de le protéger contre l'action de la ninhydrine. Trois composés soufrés, un hydrazide, se montrent sans action. Le leucocyanidol et la vitamine C, substances actives sur la perméabilité capillaire, furent essayés sans succès; bien plus, l'acide ascorbique augmente la toxicité de la ninhydrine. Le naphtionate de sodium est également inactif. Le phénergan, ainsi qu'un facteur vitaminique K, manifestent une action retardatrice sans parvenir toutefois à s'opposer complètement à l'action toxique. L'action favorable du facteur vitaminique K permettrait donc de rapprocher la ninhydrine de la phényl-2-indanedione-1,3 dont les propriétés antivitaminiques sont bien connues.

Nous envisageons enfin quelques propriétés pharmacodynamiques de la ninhydrine chez le Chien chloralosé. La tricétone, injectée dans les cavités cardiaques ou dans la circulation générale, entraîne les signes suivants : apnée, perturbation du rythme cardiaque avec nombreuses extrasystoles, hypotension artérielle avec pincement de la différentielle. La grande rapidité de réponse de l'organisme à l'injection, évoque la possibilité d'une action sur les récepteurs chimiosensibles; leur participation est montrée expérimentalement par une injection au niveau de la bifurcation carotidienne.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Le travail que nous avons consacré à l'étude de la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène ou hydrate d'indanetrione-1,2,3), réactif classique des aminoacides, se subdivise en deux parties distinctes. La première comprend l'exposé bibliographique des publications relatives aux propriétés physicochimiques, chimiques et biologiques de la tricétone; nous avons groupé dans la seconde nos recherches personnelles.

I

L'hydrate de tricétohydrindène a été obtenu pour la première fois par Ruhemann, en 1910, à partir de l'indanone-1; ce procédé de synthèse a fait place depuis à des méthodes de préparation plus commodes et présentant un meilleur rendement, méthodes que nous avons passées en revue et que nous complétons par l'exposé de différents modes d'obtention.

Les propriétés physiques de l'hydrate d'indanetrione sont encore peu connues puisque la littérature ne nous fournit que des données sur le spectre d'absorption de cette substance et sur son comportement polarographique.

Les propriétés chimiques de la ninhydrine ont fait au contraire l'objet de très nombreuses communications qui sont analysées dans notre travail. Après l'action des acides, des bases, des oxydants et des réducteurs nous examinons les dérivés obtenus à partir des réactifs fonctionnels du groupement carbonylé. La réaction principale est celle fournie par les aminoacides; après l'étude théorique de cette réaction qui s'accompagne, en plus de la formation d'une coloration bleue, de la mise en liberté de gaz carbonique, d'ammoniac et d'aldéhyde, nous envisageons les applications pratiques de cette réaction à la caractérisation chromatographique des aminoacides et à leur dosage fondé sur l'évaluation des différentes

substances qui prennent naissance au cours de la réaction ainsi que des applications cliniques et histologiques.

Cette partie théorique se termine par la description des propriétés biologiques de la ninhydrine : toxicité, action sur les protéines et spécialement sur les protéines enzymatiques ou d'importance immunologique.

II

Nos recherches personnelles ont porté tout d'abord sur la détermination de quelques propriétés physicochimiques du réactif des aminoacides : nous apportons de nombreux renseignements sur le comportement chromatographique de la ninhydrine dans treize systèmes de phases solvantes différents, et nous proposons trois réactifs pour la caractériser sur les papiers chromatographiques; nous avons effectué l'étude potentiométrique de solutions aqueuses d'hydrate d'indanetrione et confirmé son instabilité en milieu alcalin. La structure de tricétone vicinale hydratée de la ninhydrine est corroborée par l'étude du spectre d'absorption infrarouge. Quelques caractéristiques de ses cristaux sont déterminées par la diffraction des rayons X : la maille, bimoléculaire, appartient au système monoclinique et possède une hémiédrie énantiomorphe. La valeur de la densité des cristaux, que nous avons déterminée expérimentalement, correspond à la valeur théorique.

III

Nous avons consacré de nombreuses recherches expérimentales à l'étude des propriétés chimiques de la ninhydrine. Nous avons décrit la réaction que donne l'hydrate d'indanetrione avec :

— Des amines aromatiques dérivées de l'aniline, l'α-naphtylamine, l'acide naphtionique et l'α-aminopyridine;

— Divers composés azotés de l'acide carbonique : thiourée, guanidine, glycocyamine, guanidylurée.

Nous rapportons ensuite nos essais personnels réalisés avec l'hydrazine et divers dérivés de substitution : phénylhydrazines, hydrazides, etc. Selon les conditions opératoires, on observe la formation d'une mono- ou d'une dihydrazone et parfois des réactions plus complexes, du type de celle que fournit l'aminoguanidine et qui conduit à la formation d'une

triazine asymétrique. La *p*-sulfophénylhydrazine donne lieu à une réaction colorée intense, dont nous avons examiné les modalités d'apparition et les aspects chromatographiques et spectroscopiques; cette réaction permet de différencier la ninhydrine de substances très voisines, et permet son dosage spectrophotométrique. Des composés soufrés, notamment la cystéinamine et le méthyl-1-mercapto-2-imidazole manifestent sur la ninhydrine une action réductrice que nous avons pu mettre en évidence.

Ces essais ont permis d'isoler vingt-quatre substances non encore signalées dans la littérature chimique.

Nous avons porté également notre effort sur la réaction majeure de la ninhydrine, la réaction colorée avec les aminoacides. Après avoir constaté que la coloration ne se développe à froid qu'en présence de concentrations relativement élevées en ninhydrine et en aminoacides, nous avons remarqué que la réaction se montre beaucoup plus sensible en présence de solvants organiques : on observe en effet, dans des milieux peu riches en eau, que la coloration se développe à la température du laboratoire pour de plus faibles concentrations des deux réactifs. L'étude de nombreux solvants organiques nous a montré l'intérêt particulier de l'alcool butylique tertiaire; nous avons mis au point un protocole permettant l'étude photométrique précise de la cinétique de la réaction. Nous avons pu aussi étudier quelques paramètres : concentrations des réactifs, influence des sels, etc.

Des mesures conductimétriques et potentiométriques ne nous ont pas permis d'expliquer la totalité des phénomènes observés, mais il semble que l'action favorisante du méthyl-2-propanol-2, comme d'ailleurs celle des autres alcools, soit liée, au moins partiellement, à la baisse de la constante diélectrique du milieu réactionnel; cette baisse permet la transformation de l'ion bipolaire inactif de l'aminoacide (zwitterion) en une forme électriquement neutre, capable de réagir plus facilement avec la ninhydrine. L'action favorisante des solvants organiques semble d'ailleurs très générale, car on l'observe également au cours des réactions colorées alloxanne-aminoacides et ninhydrine-amines primaires.

L'utilisation de solvants organiques, et en particulier d'alcool butylique tertiaire, nous a permis d'étudier avec précision l'action sur la ninhydrine des différents aminoacides naturels ou synthétiques et de substances apparentées. Nous avons pu préciser ainsi l'influence de la longueur de la chaîne,

de la ramification et des autres groupements chimiques de la molécule d'aminoacide.

Nos essais relatifs à la réactivité des aminoacides avec la ninhydrine ont été enfin complétés par l'étude chromatographique et microcristalloscopique de la réaction : nous avons pu ainsi confirmer que la formation du colorant bleu s'accompagne de la production d'hydrindantine et de bis-dicétoindanyle. La chromatographie permet également de mettre en évidence l'aldéhyde libéré au cours de la réaction.

IV

La dernière partie de notre travail rassemble enfin les essais biologiques que nous avons effectués avec la ninhydrine ou ses dérivés.

La parenté de la ninhydrine avec l'alloxanne nous a conduit à condenser l'hydrate d'indanetrione avec le (D-ribityl-1')-amino-6-diméthyl-3,4-amino-1-benzène; nous avons ainsi obtenu des sels d'indanoquinoxalinium apparentés à la riboflavine. Après avoir étudié les propriétés physicochimiques de ces substances et discuté leur structure, nous avons montré que ces sels d'indanoquinoxalinium peuvent être considérés comme des facteurs antivitaminiques B_2 : ces substances, inactives sur *E. typhosa,* inhibent au contraire la pousse d'un *Str. fecalis,* germe nécessitant la présence de riboflavine dans le milieu de culture; cette inhibition est partiellement levée par la vitamine B_2.

L'action de la ninhydrine sur les protéines nous a amené à étudier l'influence de la tricétone sur les hématies : traitées par la ninhydrine, dans certaines conditions expérimentales, les hématies humaines ne subissent pas d'hémolyse, mais acquièrent au contraire une résistance importante vis-à-vis de l'hémolyse par hypotonie, tandis que leur comportement vis-à-vis des agents superficiellement actifs ionisés n'est pas modifié. Ces propriétés peuvent être interprétées par une action élective sur les groupements thiol des protéines de l'hématie.

Nous rapportons ensuite la détermination de la DL_{50} chez la Souris, valeur voisine de 78 mg/kg lorsque le produit est injecté par voie intrapéritonéale; des doses élevées d'hydrate d'indanetrione amènent, après une phase d'excitation, la mort rapide de l'animal qui présente des hémorragies viscérales multiples; de nombreux composés soufrés, l'acide ascorbique, un facteur vitaminique P, le naphtionate de sodium, l'isonia-

zide s'avèrent incapables de prolonger la survie de l'animal, tandis qu'un facteur vitaminique K et un antihistaminique présentent une légère action favorable chez la souris ninhydrinée.

Des essais effectués chez le chien chloralosé ont montré que la ninhydrine possède une intense action pharmacodynamique. L'injection est immédiatement suivie de polypnée puis d'une phase d'apnée, de l'apparition d'extrasystoles associées à une hypotension artérielle avec pincement de la pression différentielle; on note en outre une légère hypertension pulmonaire et une augmentation de la pression veineuse; ces effets sont explicables, au moins partiellement, par une action sur les centres chimiosensibles de la bifurcation carotidienne.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu :

Le Doyen,

R. SIGALAS.

Vu, bon à imprimer :

Le Président,

F. TAYEAU.

Vu et permis d'imprimer :

Bordeaux, le 10 mai 1957

Le Recteur,

E. DELAGE.

APPENDICE

TABLEAUX XIX A XXXI

TABLEAU XIX

Cinétique de la réaction ninhydrine-monoacides monoaminés aliphatiques a chaine linéaire.

t minutes	*I*	*II*	*II a*	*II b*	*III*	*IV*	*V*
15	0,134	0,040	0,029	0,036	0,045	0,091	0,104
30	0,255	0,067	0,058	0,061	0,091	0,174	0,198
45	0,380	0,095	0,090	0,087	0,136	0,257	0,300
60	0,510	0,121	0,119	0,111	0,185	0,345	0,400
75	0,622	0,150	0,149	0,137	0,229	0,428	0,494
90	»	0,176	0,178	0,161	0,275	0,488	0,585
105	»	0,207	0,210	0,187	0,328	0,600	»
120	»	0,235	0,240	0,213	0,376	»	»
135	»	0,261	0,270	0,240	0,422	»	»
150	»	0,288	0,300	0,263	0,470	»	»
165	»	0,317	0,331	0,290	0,515	»	»
180	»	0,342	0,360	0,312	0,562	»	»

TABLEAU XX

Cinétique de la réaction ninhydrine-monoacides monoaminés aliphatiques a chaine ramifiée.

t minutes	*VI*	*VI a*	*VI b*	*VII*	*VII a*	*VII b*	*VIII*	*VIII a*	*VIII b*
15	0,050	0,052	0,058	0,188	0,176	0,188	0,066	0,055	0,060
30	0,093	0,094	0,098	0,379	0,355	0,372	0,114	0,105	0,108
45	0,134	0,136	0,141	0,560	0,528	0,550	0,158	0,153	0,155
60	0,174	0,187	0,184	0,749	0,705	0,732	0,212	0,209	0,209
75	0,215	0,220	0,226	»	»	»	0,256	0,253	0,254
90	0,255	0,261	0,270	»	»	»	0,308	0,310	0,308
105	0,296	0,305	0,311	»	»	»	0,363	0,367	0,362
120	0,338	0,350	0,355	»	»	»	0,422	0,427	0,421
135	0,380	0,400	0,400	»	»	»	0,473	0,480	0,472
150	0,420	0,433	0,440	»	»	»	0,528	0,538	0,528
165	0,460	0,474	0,481	»	»	»	»	»	»
180	0,500	0,515	0,522	»	»	»	»	»	»

TABLEAU XXI

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec la β-alanine, l'acide γ-aminobutyrique, divers aminoacides hydroxylés et leurs dérivés.

t minutes	*IX*	*XI*	*XII*	*XIII*	*XIV*	*XIV a*	*XV*	*XVI*
15	0,012	0,022	0,046	0,094	0,068	0,062	0,063	0,045
30	0,015	0,053	0,082	0,174	0,124	0,104	0,120	0,086
45	0,019	0,095	0,122	0,260	0,184	0,147	0,170	0,125
60	0,025	0,130	0,160	0,342	0,252	0,196	0,221	0,170
75	0,031	0,161	0,200	0,422	0,317	0,243	0,278	0,214
90	0,036	0,202	0,240	0,510	0,382	0,293	0,328	0,260
105	0,042	0,235	0,280	0,590	0,451	0,345	0,380	0,308
120	0,050	0,277	0,320	0,678	0,525	0,398	0,432	0,362
135	0,054	0,310	0,365	»	0,582	0,445	0,485	0,405
150	0,064	0,350	0,402	»	»	0,500	0,532	0,450
165	0,070	0,385	0,440	»	»	»	0,585	0,495
180	0,075	0,420	0,480	»	»	»	0,632	0,530

TABLEAU XXII

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec divers aminoacides soufrés, divers diacides monoaminés et avec la glutamine.

t minutes	*XVII*	*XVII a*	*XVIII*	*XVIII a*	*XIX*	*XX*	*XXI*	*XXII*	*XXIII*
15	0,046	0,043	0,016	0,020	0,159	0,207	0,014	0,053	0,074
30	0,082	0,075	0,025	0,032	0,306	0,398	0,026	0,103	0,139
45	0,115	0,103	0,034	0,044	0,452	0,588	0,034	0,152	0,201
60	0,149	0,132	0,044	0,054	0,592	0,770	0,045	0,200	0,260
75	0,180	0,166	0,051	0,065	»	»	0,055	0,247	0,308
90	0,215	0,194	0,063	0,076	»	»	0,067	0,296	0,376
105	0,248	0,222	0,071	0,086	»	»	0,077	0,342	0,437
120	0,282	0,254	0,082	0,097	»	»	0,090	0,390	0,495
135	0,314	0,285	0,092	0,111	»	»	0,104	0,440	0,555
150	0,348	0,315	0,102	0,122	»	»	0,114	0,482	0,614
165	0,380	0,345	0,111	0,132	»	»	0,127	0,530	0,670
180	0,415	0,374	0,120	0,142	»	»	0,141	0,575	»

TABLEAU XXIII

Cinétique de la réaction ninhydrine-diaminoacides.

t minutes	*XXIV*	*XXIV a*	*XXIV b*	*XXV*	*XXV a*	*XXV b*	*XXVI*	*XXVII*	*XXVII a*	*XXVIII*	*XXVIII a*
15	0,024	0,021	0,031	0,014	0,014	0,020	0,055	0,039	0,023	0,033	0,012
30	0,027	0,024	0,038	0,017	0,019	0,026	0,099	0,048	0,027	0,045	0,016
45	0,030	0,026	0,042	0,020	0,024	0,032	0,141	0,059	0,031	0,059	0,021
60	0,032	0,029	0,046	0,024	0,028	0,037	0,187	0,066	0,037	0,076	0,024
75	0,035	0,032	0,051	0,029	0,034	0,043	0,228	0,077	0,042	0,090	0,031
90	0,039	0,035	0,056	0,030	0,040	0,046	0,270	0,089	0,045	0,104	0,034
105	0,043	0,038	0,062	0,033	0,045	0,052	0,316	0,100	0,051	0,120	0,040
120	0,046	0,041	0,066	0,039	0,051	0,057	0,359	0,116	0,057	0,140	0,045
135	0,050	0,044	0,072	0,041	0,060	0,064	0,406	0,124	0,062	0,153	0,050
150	0,054	0,047	0,077	0,046	0,063	0,070	0,448	0,134	0,068	0,170	0,056
165	0,058	0,050	0,084	0,049	0,068	0,077	0,492	0,146	0,074	0,184	0,060
180	0,061	0,054	0,090	0,054	0,075	0,085	0,537	0,152	0,077	0,204	0,068

TABLEAU XXIV

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides benzéniques.

t minutes	*XXIX*	*XXIX a*	*XXIX b*	*XXIX c*	*XXX*	*XXXI*
15	0,235	0,192	0,224	0,230	0,157	0,035
30	0,432	0,360	0,420	0,430	0,290	0,161
45	0,602	0,520	0,594	0,608	0,421	0,230
60	»	0,670	»	»	0,552	0,286
75	»	»	»	»	0,675	0,332
90	»	»	»	»	»	0,372
105	»	»	»	»	»	0,410
120	»	»	»	»	»	0,440
135	»	»	»	»	»	0,470
150	»	»	»	»	»	0,500
165	»	»	»	»	»	0,520
180	»	»	»	»	»	0,550

TABLEAU XXV

Cinétique de la réaction ninhydrine-aminoacides hétérocycliques.

	t minutes	
	15	**30**
XXXII . .	0,334	0,625
XXXII a .	0,409	0,760
XXXII b	0,412	0,770
XXXII c .	0,346	0,655
XXXIII . .	0,292	0,510

TABLEAU XXVI

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec quelques peptides.

t minutes	*XL*	*XLI*	*XLII*	*XLIII*	*XLIV*	*XLV*	*XLV a*	*XLV b*	*XLVI*	*XLVII*	*XLVIII*
15	0,015	0,003	0,000	0,000	0,001	0,016	0,018	0,014	0,013	0,008	0,084
30	0,020	0,017	0,012	0,025	0,004	0,025	0,024	0,022	0,021	0,019	0,097
45	0,030	0,043	0,030	0,052	0,008	0,038	0,040	0,036	0,034	0,040	0,107
60	0,042	0,075	0,056	0,087	0,013	0,058	0,059	0,056	0,050	0,066	0,118
75	0,058	0,117	0,090	0,133	0,017	0,081	0,081	0,079	0,065	0,100	0,130
90	0,077	0,165	0,128	0,182	0,025	0,106	0,105	0,106	0,080	0,137	0,153
105	0,098	0,220	0,171	0,238	0,030	0,133	0,132	0,131	0,095	0,182	0,164
120	0,122	0,280	0,220	0,300	0,038	0,160	0,157	0,156	0,111	0,225	0,183
135	0,150	0,340	0,272	0,365	0,045	0,186	0,184	0,183	0,125	0,271	0,202
150	0,175	0,400	0,328	0,432	0,053	0,216	0,211	0,211	0,142	0,318	0,223
165	0,204	0,470	0,380	0,505	0,060	0,242	0,238	0,239	0,157	0,370	0,248
180	0,233	0,530	0,438	0,570	0,068	0,270	0,268	0,265	0,173	0,425	0,274

TABLEAU XXVII

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec la colamine et la sarlosine.

t minutes	*XLIX*	*XLIX a*	*L*
15	0,018	0,016	0,000
30	0,020	0,021	0,001
45	0,024	0,027	0,003
60	0,029	0,036	0,004
75	0,035	0,045	0,004
90	0,046	0,055	0,006
105	0,046	0,063	0,006
120	0,053	0,073	0,008
135	0,059	0,082	0,009
150	0,065	0,090	0,010
165	0,070	0,100	0,010
180	0,076	0,106	0,014

TABLEAU XXVIII

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec quelques monoamines dérivées des aminoacides.

t minutes	*LII*	*LII a*	*LIII*	*LIII a*	*LIV*	*LIV a*
15	0,010	0,006	0,018	0,014	0,016	0,022
30	0,012	0,007	0,019	0,014	0,016	0,022
45	0,012	0,008	0,021	0,014	0,016	0,022
60	0,012	0,008	0,025	0,017	0,020	0,022
75	0,016	0,010	0,030	0,018	0,023	0,025
90	0,020	0,014	0,039	0,022	0,030	0,026
105	0,025	0,017	0,046	0,026	0,035	0,033
120	0,031	0,025	0,057	0,030	0,043	0,035
135	0,036	0,023	0,068	0,034	0,053	0,036
150	0,044	0,026	0,083	0,041	0,062	0,044
165	0,051	0,027	0,095	0,047	0,074	0,046
180	0,058	0,033	0,110	0,055	0,086	0,053

TABLEAU XXIX

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec quelques monoamines dérivées des aminoacides.

t minutes	*LV*	*LV a*	*LVI*	*LVI a*	*LVII*	*LVII a*
15	0,007	0,007	0,036	0,038	0,023	0,032
30	0,016	0,024	0,037	0,038	0,030	0,040
45	0,025	0,027	0,038	0,037	0,040	0,045
60	0,044	0,028	0,039	0,034	0,056	0,050
75	0,070	0,044	0,043	0,034	0,077	0,061
90	0,102	0,063	0,047	0,033	0,102	0,074
105	0,132	0,085	0,055	0,035	0,126	0,087
120	0,168	0,103	0,064	0,036	0,155	0,104
135	0,208	0,125	0,076	0,043	0,185	0,124
150	0,245	0,150	0,091	0,044	0,215	0,137
165	0,286	0,173	0,110	0,050	0,245	0,154
180	0,322	0,196	0,124	0,055	0,270	0,168

TABLEAU XXX

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec des diamines dérivées des aminoacides.

t minutes	*LVIII*	*LVIII a*	*LIX*	*LIX a*	*LX*	*LX a*	*LXI*	*LXI a*
15	0,086	0,084	0,020	0,008	0,018	0,012	0,018	0,016
30	0,130	0,149	0,020	0,010	0,024	0,016	0,018	0,019
45	0,176	0,210	0,020	0,010	0,025	0,021	0,018	0,019
60	0,231	0,268	0,020	0,010	0,027	0,025	0,019	0,021
75	0,268	0,328	0,020	0,012	0,032	0,026	0,022	0,024
90	0,320	0,380	0,023	0,014	0,032	0,029	0,022	0,024
105	0,365	0,440	0,023	0,015	0,037	0,036	0,024	0,028
120	0,420	0,502	0,023	0,018	0,043	0,038	0,025	0,032
135	0,465	0,562	0,025	0,022	0,046	0,042	0,026	0,035
150	0,515	0,606	0,027	0,025	0,049	0,045	0,028	0,037
165	0,562	»	0,030	0,026	0,054	0,049	0,034	0,040
180	0,619	»	0,034	0,032	0,056	0,051	0,034	0,045

TABLEAU XXXI

Cinétique de la réaction de la ninhydrine avec divers composés d'intérêt biologique.

t minutes	*LXII*	*LXII a*	*LXIII*	*LXIV*	*LXV*	*LXV a*
15	0,035	0,051	0,847	0,005	0,018	0,017
30	0,041	0,055	»	0,005	0,033	0,039
45	0,047	0,056	»	0,006	0,061	0,081
60	0,055	0,060	»	0,006	0,093	0,127
75	0,062	0,064	»	0,006	0,126	0,182
90	0,070	0,073	»	0,007	0,165	0,235
105	0,077	0,076	»	0,007	0,205	0,292
120	0,086	0,084	»	0,007	0,243	0,350
135	0,094	0,089	»	0,007	0,280	0,410
150	0,102	0,096	»	0,007	0,321	0,470
165	0,109	0,101	»	0,007	0,362	0,528
180	0,118	0,109	»	0,007	0,402	0,588

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les numéros en italique et entre parenthèses qui se trouvent à la fin de chaque référence bibliographique indiquent les pages du texte où la référence a été citée.

1. Abderhalden (E.). — Weiterer Beitrag zur Frage nach dem Einfluss des Blutgehaltes der Substrate auf das Ergebnis der Prüfung auf spezifisch eingestellte Abwehrfermente mittels des Dialysierverfahrens. *Münch. med. Wochschr.*, 1913, **60**, 2774-2776. *(69)*
2. Abderhalden (E.). — Kritische Bemerkungen. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 546-548. *(69)*
3. Abderhalden (E.). — Bemerkungen zu der Arbeit von L. Michaelis und L. v. Lagermarck über die Abderhaldensche Schwangerschaftsdiagnose. *Deut. med. Wochschr.*, 1914, **40**, 428-429. *(69)*
4. Abderhalden (E.). — Anwendung der Tüpfelreaktion bei der Ausführung der Ninhydrinprobe. *Mikrochemie, Festschr. von Hans Molisch*, 1936, pp. 1-2. *(69)*
5. Abderhalden (E.). — Weiterer Beitrag zur Vereinfachung der Methodik des Nachweises von Abwehrproteinasen in Harn. *Fermentforsch.*, 1936-1938, **15**, 348-351. *(69)*
6. Abderhalden (E.). — Nachtrag zur Methodik der A.-R. *Fermentforsch.*, 1940, **16**, 297-298. *(69)*
7. Abderhalden (E.). — Beitrag zum Problem der Alloxan-, Alloxantin-, Ninhydrin- und Ninhydrinharnstoffwirkung auf den tierischen Organismus. *Z. Vitamin-, Hormon- u. Fermentforsch.*, 1947, **1**, 241-256. *(72, 73)*
8. Abderhalden (E.) & Fodor (A.). — Weitere Untersuchungen über das Auftreten blutfremder proteolytischer Fermente im Blute Schwangerer. Untersuchung des Dialysates mittels Ninhydrin und gleichzeitiger Feststellung seines Stickstoffgehaltes mittels Mikroanalyse. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 765-767. *(69)*
9. Abderhalden (E.) & Grigorescu (L.). — Biologische Prüfung der Ergebnisse des Dialysierverfahrens. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 767. *(69)*
10. Abderhalden (E.) & Schmidt (H.). — Über die Verwendung von Triketohydrindenhydrat zum Nachweis von Eiweissstoffen und deren Abbaustufen. *Z. physiol. Chem.*, 1911, **72**, 37-43. *(51, 53, 55, 58, 61)*

11. Abderhalden (E.) & Schmidt (H.). — Einige Beobachtungen und Versuche mit Triketohydrindenhydrat (Ruhemann). *Z. physiol. Chem.*, 1913, **85**, 143-147. *(61)*

12. Abderhalden (R.). — Über die Einwirkung von Ninhydrin, Alloxan und Isatin auf Aminosäuren und Polypeptide. *Z. physiol. Chem.*, 1938, **252**, 81-94. *(28, 43, 61, 63, 64, 159)*

13. Acher (R.) & Crocker (C.). — Réactions colorées spécifiques de l'arginine et de la tyrosine réalisées après chromatographie sur papier. *Biochim. biophys. Acta*, 1952, **9**, 704-705. *(66)*

14. Adant (M.). — L'azoprotéine gélatine-aniline. *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 541-543. *(75)*

15. Alberty (R. A.). — Electrochemical properties of the proteins and amino acids. *In* Neurath (H.) et Bailey (K.); The Proteins, 2 vol. (4 parties), Academic Press Inc. édit., New York, 1953-1954; vol. I, part. A, pp. 461-548. *(153)*

16. Alexander (B.), Landwehr (G.) & Seligman (A. M.). — A specific micromethod for the colorimetric determination of glycine in blood and urine. *J. biol. Chem.*, 1945, **160**, 51-59. *(63)*

17. Alexander (B.) & Seligman (A. M.). — A colorimetric method for the microdetermination of α-alanine in blood. *J. biol. Chem.*, 1945, **159**, 9-19. *(63)*

18. Allinson (J. C.). — Colorimetric estimation of penicillin in aqueous solutions. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1945, **60**, 293. *(65)*

19. Ambler (J. A.). — Amino acids and related compounds in sugar products. I. A simple colorimetric test for amino acids. *Intern. Sugar J.*, 1927, **29**, 382-385. *(68)*

20. Ambler (J. A.) & Snider (J. B.). — Interference of reducing sugars in ninhydrin reaction for amino acids and related compounds as applied to carbohydrates. *Ind. Engng. Chem., Anal. Ed.*, 1932, **4**, 37. *(65, 68)*

21. Aminoff (D.) & Morgan (W. T. J.). — Hexosamine components of the human blood group substances. *Nature*, 1948, **162**, 579-580. *(68)*

22. Anderson (R. C.), Worth (H. M.), Welles (J. S.), Harris (P. N.) & Chen (K. K.). — Pharmacology and toxicology of cycloserine. *Antibiot. Chemother.*, 1956, **6**, 360-368. *(188)*

23. Atkinson (R. O.), Stuart (R. G.) & Stuckey (R. E.). — Colours developed in the paper chromatography of amino-acids. *Analyst*, 1950, **75**, 447. *(65)*

24. Awapara (J.). — Application of paper chromatography to the estimation of some free amino acids in tissues of the rat. *J. biol. Chem.*, 1949, **178**, 113-116. *(66, 67)*

25. Bacq (Z. M.). — On chemical protection against ionizing radiation. *Acta radiol.*, 1954, **41**, 59-60. *(110)*

26. Baddar (F. G.). — The electronic interpretation of the Strecker degradation. *J. chem. Soc.*, 1949, Suppl. issue, S 163-S 167. *(48)*

27. Baeyer (A.) & Perkin (W. H. Jr.). — Ueber Derivate des Hydrindonaphtens. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1884, **17,** 122-125. *(10)*

28. Barakat (M. Z.), Wahba (N.) & El-Sadr (M. M.). — The detection and differentiation of some aromatic amines. *Analyst*, 1954, **79,** 715-717. *(68)*

29. Baraud (J.). — Une nouvelle méthode de dosage de l'acide ascorbique. *Bull. Soc. chim. France*, 1951, 5e sér., **18,** 837-843. *(103)*

30. Barclay (W. R.) & Russe (H.). — The *in vitro* action of cycloserine on *M. tuberculosis*. *Am. Rev. Tuberc.*, 1955, **72,** 236-241. *(188)*

31. Barrollier (J.). — Ein Ninhydrinreagenz für quantitative Aminosaürebestimmungen auf Papierchromatogrammen. *Naturwiss.*, 1955, **42,** 416. *(66, 67)*

32. Baume (M.). — Quelques aspects de la réactivité chimique de l'isoniazide. Thèse Doct. Univ. (Pharmacie), Bordeaux 1956, n° 393; 1 vol., 191 p., Impr. E. Drouillard édit., Bordeaux, 1956. *(197)*

33. Beck (M.) & Csaszar (J.). — The paper chromatography of metal complexes of amino acids (Preliminary communication). *Magyar Kém. Foly.*, 1955, **61,** 447-448. *(65)*

34. Bednarczyk (W.) & Marchlewski (L.). — Zur Kenntnis der Azine. *Biochem. Z.*, 1938, **300,** 46-55. *(204, 208)*

35. Benesch (R. E.) & Benesch (R.). — Relation between erythrocyte integrity and sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **48,** 38-42. *(218)*

36. Benson (W. M.), Stefco (P. L.) & Roe (D. M.). — Pharmacologic and toxicologic observations on hydrazine derivatives of isonicotinic acid. *Am. Rev. Tuberc.*, 1952, **65,** 376-391. *(226)*

37. Berg (W.). — Sind die Schollen des in den Leberzellen gespeicherten Eiweisses vital präformierte Gebilde ? *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1922, **194,** 102-108. *(69)*

38. Berg (W.). — Über Anwendung der Ninhydrinreaktion auf mikroskopische Präparate zum Nachweis niederer Eiweisskörper : 1. In den Leberzellen (gespeichertes Eiweiss) ; 2. Im Blut. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1922, **195,** 543-554. *(69)*

39. Berg (W.). — Über histochemische Eiweissreaktionen an körperlichen Elementen des Blutes. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1923, **199,** 656-659. *(69)*

40. Berg (W.). — Zum histologischen Nachweis der Eiweissspeicherung in der Leber. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 1926, **214,** 243-249. *(69)*

41. Bertrand (J.). — Sur la réaction dite « de la ninhydrine » et sur les causes d'erreur dans son application au dosage de la fonction amino-acide, dans les liquides biologiques. Thèse Doct. Pharm., Lille 1938; 1 vol., 98 p., Impr. A. Taffin-Lefort édit., Paris-Lille, 1938. *(14, 32, 33, 54, 61, 158)*

42. Birch (T. W.) & Harris (L. J.). — Zwitterions. II. Amino acids, polypeptides, etc..., and proteins as zwitterions with instances of non-zwitterion ampholytes. *Biochem. J.*, 1930, **24,** 1086-1097. *(153)*

42 a. Birckner (V.). — Acidimetric titration of grain extracts and amino-acids in the presence of alcohol. *J. biol. Chem.*, 1919, **38,** 245-254. *(151)*

43. Bjerrum (N.). — Die Konstitution der Ampholyte, besonders der Aminosäuren, und ihre Dissoziationskonstanten. *Z. phys. Chem.*, 1923, **104,** 147-173. *(153)*

44. Block (R. J.). — Quantitative estimation of amino acids on paper chromatograms. *Science,* 1948, **108,** 608-609. *(66)*

45. Block (R. J.). — Estimation of amino acids and amines on paper chromatograms. *Anal. Chem.*, 1950, **22,** 1327-1332. *(66, 68)*

46. Block (R. J.), Durrum (E. L.) & Zweig (G.). — A manual of paper chromatography and paper electrophoresis. 1 vol., 484 p., Academic Press Inc. édit., New York 1955. *(65)*

47. Block (R. J.) & Weiss (K. W.). — Amino acid handbook. 1 vol., 386 p., Charles C. Thomas édit., Springfield (Illinois), U. S. A., 1956. *(65)*

48. Bode (F.). — Eine Vereinfachung und Verbesserung der Methode zur quantitative Bestimmung von Aminosaüren Peptiden mittels des Ninhydrin-Kupferkomplexes. *Biochem. Z.*, 1955, **326,** 433-435. *(67)*

49. Bode (F.). — Die quantitative Bestimmung des Aminostickstoffs. *Experientia,* 1953, **9,** 271-274. *(67)*

50. Bode (F.), Hübener (H. J.), Brückner (H.) & Hoeres (K.). — Eine einfache quantitative Bestimmung von Aminosäuren im Papierchromatogramm. *Naturwiss.*, 1952, **39,** 524-525. *(67)*

51. Böhm (F.). — In welcher Form scheiden Kaninchen Substanzen aus, die einen mit einem Benzolring gekuppelten Fünfring enthalten und dem Indoltypus nahe stehen ? *Z. physiol. Chem.*, 1941, **269,** 17-23. *(73)*

52. Boissonnas (R. A.). — Révélation ponctuelle des acides aminés, des polypeptides et des sucres séparés par chromatographie sur papier. (Etudes chromatographiques II.) *Helv. chim. Acta,* 1950, **33,** 1972-1974. *(66)*

53. Boissonnas (R. A.). — Dosage colorimétrique des acides aminés séparés par chromatographie sur papier. (Etudes

chromatographiques III.) *Helv. chim. Acta*, 1950, **33**, 1975-1982. *(66, 67)*

54. Bolland (A.) & Nobel (E.). — Über die Anwendbarkeit des Ninhydrins in der Massanalyse. *Chem. Ztg.*, 1915, **39**, 727. *(68)*

55. Bose (P. K.). — Ein neuer empfindlicher Nachweis reduzierender Kohlenhydrate. *Z. anal. Chem.*, 1931, **87**, 110-114. *(28)*

56. Boulanger (P.) & Biserte (G.). — La chromatographie de partage. *Exp. ann. Bioch. méd.*, 1950, **11**, 53-121; Acides aminés libres et combinés de l'urine humaine. *Ibid.*, 1956, **18**, 123-164. *(65)*

57. Bremner (J. M.) & Kenten (R. H.). — Paper chromatography of amines. *Biochem. J.*, 1951, **49**, 651-654. *(57, 58)*

58. Breton (J. C.), Schmitt (H.) & Neuzil (E.). — Toxicité aiguë de la ninhydrine (hydrate d'indanetrione) pour la Souris blanche. *C. R. Soc. Biol.*, 1957, **151**, 719-722. *(223)*

59. Bricas (E.) & Machebœuf (M.). — Action de la ninhydrine sur la toxine tétanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 1120-1122. *(75)*

60. Brimley (R. C.). — Quantitative paper chromatography. *Nature*, 1949, **163**, 215-216. *(66)*

61. Brimley (R. C.) & Barrett (F. C.). — Practical chromatography. 1 vol., 128 p., Chapman et Hall édit., Londres, 1954. *(65)*

62. Brockway (L. O.) & Taylor (T. W. J.). — The structure and stereochemistry of simple organic molecules. *Ann. Rep. Progr. Chem.*, 1937, **34**, 196-220. *(10)*

63. Brooks (C. J. W.) & Young (L.). — Biochemical studies of toxic agents. 9. The metabolic conversion of indene into *cis*- and *trans*-indane-1:2-diol. *Biochem. J.*, 1956, **63**, 264-269. *(73)*

64. Brown (M.), Yeadon (D. A.), Goldblatt (L. A.) & Dieckert (J. W.). — Chromatography of phospholipides and related compounds on glass paper impregnated with silicic acid. *Anal. Chem.*, 1957, **29**, 30-31. *(68)*

65. Brückmann (G.). — Method for the determination of alloxan. *J. biol. Chem.*, 1946, **165**, 103-113. *(31)*

66. Brückmann (G.) & Wertheimer (E.). — Alloxan studies : the action of alloxan homologues and related compounds. *J. biol. Chem.*, 1947, **168**, 241-256. *(52, 62, 72, 73, 74)*

67. Bruns (F.). — Hemmung der Xanthinoxydase durch Isatin, Ninhydrin und Alloxan. *Naturwiss.*, 1954, **41**, 360. *(75)*

68. Brush (M. K.), Boutwell (R. K.), Barton (A. D.) & Heidelberger (C.). — Destruction of amino acids during filter paper chromatography. *Science*, 1951, **113**, 4-6. *(67)*

69. Bühler (H. H.) & Zahn (H.). — Paper-chromatographic examination of wool-polyamide fibre blends. *Melliand Textilber.*, 1955, **36**, 980-981. *(68)*

70. Bull (H. B.), Hahn (J. W.) & Baptist (V. H.). — Filter paper chromatography. *J. am. chem. Soc.*, 1949, **71**, 550-553. *(66)*

71. Burgen (A. S. V.) & Lorch (J. I.). — The action of alloxan and related compounds on alkaline phosphatases. *Biochem. J.*, 1947, **41**, 223-226. *(74)*

72. Capdejelle (I. A.). — Recherches sur le mécanisme de la réaction d'agglutination spécifique. Thèse Doct. Univ. (Pharmacie) Bordeaux 1954, n° 379; 1 vol., 118 p., Impr. E. Drouillard édit., Bordeaux, 1954. *(76)*

73. Carpentier (D. C.). — The reaction of formaldehyde with l (-) histidine. *J. am. chem. Soc.*, 1945, **67**, 1247-1249. *(112)*

74. Cerecedo (L. R.). — Studies on the physiology of pyrimidines. VI. The fate of parabanic acid, alloxan, and alloxantin in the organism of the dog. *J. biol. Chem.*, 1931, **93**, 283-291. *(73)*

75. Chargaff (E.) & Bendich (A.). — On the coagulation of fibrinogen. *J. biol. Chem.*, 1943, **149**, 93-110. *(62)*

76. Chargaff (E.) & Ziff (M.). — Coagulation of fibrinogen by simple organic substances as a model of thrombin action. *J. biol. Chem.*, 1941, **138**, 787-788. *(62)*

77. Cherbuliez (E.) & Herzenstein (A.). — Sur un nouveau procédé de dosage global des amino-acides et polypeptides. *Helv. chim. Acta*, 1934, **62**, 1440-1443. *(61, 67)*

78. Cherbuliez (E.) & Herzenstein (A.). — Etude de la teneur du sérum sanguin de l'Homme en amino-acides et polypeptides, à l'aide d'un nouveau procédé de dosage global de ces corps. *Bull. Acad. Méd.*, 1934, **112**, 670-673. *(67)*

79. Cherbuliez (E.) & Mirimanoff (A.). — Sur le dosage différentiel des albumoses, polypeptides et amino-acides à l'aide de la ninhydrine (tricétohydrindène); son application au sang. *C. R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève*, 1935, **52**, 150-152. *(67, 79)*

80. Cherbuliez (E.) & Trufus (I.). — Nouveau procédé de dosage des amino acides et peptones du sérum sanguin. *C. R. Soc. Phys. Hist. nat. Genève*, 1933, **50**, 154-155. *(67)*

81. Chinard (F. P.). — Photometric estimation of proline and ornithine. *J. biol. Chem.*, 1952, **199**, 91-95. *(59, 65)*

82. Chinard (F. P.) & van Slyke (D. D.). — Comparison of a modified Folin photometric procedure and the ninhydrin manometric method for the determination of amino acid nitrogen in plasma. *J. biol. Chem.*, 1947, **169**, 571-581. *(64)*

83. Christensén (B. E.), West (E. S.) & Dimick (K. P.). — A simple apparatus and procedure for determination of amino acids by the ninhydrin reaction. *J. biol. Chem.*, 1941, **137**, 735-738. *(64)*

84. Christensen (H. N.), Riggs (T. R.) & Ray (N. E.). — Glycine determination in tissues. Conditions for valid analysis by method of Alexander, Landwehr and Seligman. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 1521-1522. *(63, 64)*

85. Ciusa (R.) & Ciusa (W.). — Influenza dei solventi sul colore del *p*-nitrofenilidrazone della *p*-dimetilaminobenzaldeide. *Gazz. chim. ital.*, 1951, **81**, 262-265. *(98)*

86. Clark (J. B.), Wyss (O.) & Stone (W. S.). — Induction of mutation in *Micrococcus pyogenes* by chemical inactivation of sulfhydryl groups. *Nature*, 1950, **166**, 340-341. *(72)*

87. Clarkson (T. W.). — A sensitive reaction on paper of ninhydrin with hydroxyproline and proline. *Biochim. biophys. Acta*, 1955, **18**, 453-454. *(60)*

88. Clasper (M.), Haslam (J.) & Mooney (E. F.). — The identification of nylon and related polymers by paper chromatography. *Analyst*, 1957, **82**, 101-107. *(68)*

89. Clutton (R. F.), Harington (C. R.) & Yuill (M. E.). — Studies in synthetic immunochemistry. II. Serological investigation of O-β-glucosidotyrosyl derivatives of proteins. *Biochem. J.*, 1938, **23**, 1111-1118. *(75)*

90. Cockburn (R.), Jagger (L. G.) & Speakman (J. B.). — Action of ninhydrin on keratin. *Nature*, 1953, **172**, 75. *(62)*

91. Cocking (E. C.) & Yemm (E. W.). — Estimation of amino acids by ninhydrin. *Biochem. J.*, 1954, **58**, xii. *(67)*

92. Consden (R.) & Gordon (A. H.). — Effect of salt on partition chromatography. *Nature*, 1948, **162**, 180-181. *(67)*

93. Consden (R.), Gordon (A. H.) & Martin (A. J. P.). — Qualitative analysis of proteins : a partition chromatographic method using paper. *Biochem. J.*, 1944, **38**, 224-232. *(65, 66)*

94. Consden (R.), Gordon (A. H.) & Martin (A. J. P.). — A study of the acidic peptides formed on the partial acid hydrolysis of wool. *Biochem. J.*, 1949, **44**, 548-560. *(65)*

95. Conzelman (G. M. Jr.). — Excretion and metabolism of D-4-amino-3-isoxazolidone (cycloserine) by the *Rhesus* monkey. *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 444-447. *(188)*

96. Copley (N. G.). — Alloxan and the « Ninhydrin » test. *Analyst*, 1941, **66**, 492-493. *(66)*

97. Cordier (D.). — Le rôle des hématies dans le transport et la mise en réserve des substances minérales et organiques. *J. Physiol. (Paris)*, 1952, **44**, 353-380. *(214)*

98. Crastes de Paulet (A.). — Recherches sur l'hydrolyse et la désamination des oligo-peptides et des « peptones ». Thèse Doct. Méd., Montpellier 1953, 1 vol., 93 p., dactyl. *(39, 64)*

99. Cristol (Paul), Benezech (C.), Cristol (Pierre) & Llory (J.). — Recherches sur les désaminations par la ninhydrine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1952, **34**, 123-134. *(56, 58, 64)*

100. Cristol (Paul), Benezech (C.) & Crastes de Paulet (A.). — Action de la chloramine T et de la ninhydrine sur quelques oligopeptides de synthèse. *Bull. Soc. chim. France*, 1955, pp. 183-189. *(61, 64)*

101. Cristol (Paul), Crastes de Paulet (A.) & Cristol (Pierre). — Action de l'acide nitreux, de la chloramine T et de la ninhydrine sur les glycyl, alanyl, leucyl peptides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, **38**, 639-647. *(61, 64)*

102. Cristol (Pierre). — Recherches sur les désaminations des acides aminés. Etude chimique. Application aux dosages dans les milieux biologiques. Thèse Doct. Méd., Montpellier 1953, n° 84; 1 vol., 69 p., Impr. Causse, Graille & Castelnau édit., Montpellier, 1953; et paru dans *Montpellier méd.*, 1953, **43**, 521-580. *(56, 58, 64, 158, 182)*

103. Crumpler (H. R.) & Dent (C. E.). — Distinctive test for α-amino acids in paper chromatography. *Nature*, 1949, **164**, 441-442. *(67)*

104. Cummings (M. M.), Patnode (R. A.) & Hudgins (P. C.). — Effect of cycloserine on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 198-203. *(188)*

105. Curzon (G.) & Giltrow (J.). — Aromatic aldehydes as specific chromatographic colour reagents for amino acids. *Nature*, 1954, **173**, 314. *(112)*

106. Dakin (H. D.) & Dudley (H. W.). — The interconversion of α-amino-acids, α-hydroxy-acids and α-ketonic aldehydes. *J. biol. Chem.*, 1913, **15**, 127-143. *(43)*

107. Das (A. K.) & Ghosh (B. N.). — Azo compounds from diketo-hydrindene. *J. am. chem. Soc.*, 1921, **43**, 1739-1741. *(32)*

108. Davies (D. F.), Wolfe (K. M.) & Perry (H. M. Jr.). — Studies on primary amines. I. Methods. *J. Lab. clin. Med.*, 1953, **41**, 802-811. *(55, 56, 57, 68)*

109. De (S. C.). — Action of hydrazides. Part I. Synthesis of triazines from aminoguanidine and diketones. *Quart. J. indian chem. Soc.*, 1927, **4**, 183-188. *(99)*

110. De (S. C.) & Dutta (P. C.). — Synthese von Triazinen : Einwirkung von Amino-guanidin auf o-Diketone. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1931, **64 B**, 2604-2606. *(99)*

111. Deetjen (H.) & Fraenkel (E.). — Untersuchung über die Ninhydrinreaktion des Glukosamins und über Fehlerquellen bei der Ausführung von Abderhaldens Dialysierverfahren. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 466-468. *(69)*

112. Deetjen (H.) & Fraenkel (E.). — Der Einfluss der Konzentration der Substanzen auf die Ninhydrinreaktion. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 826. *(69)*

113. Denigès (G.). — Sur un complément nouveau à la réaction de Ruhemann pour la recherche des peptides et des acides α-aminés. *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1914, **54**, 49-52. *(67)*

114. Denigès (G.). — Sur un complément nouveau à la réaction de Ruhemann pour la recherche des peptides et des acides α-aminés. *J. Pharm. Chim.*, 1914, 7e sér., **9**, 474-475. *(67)*

115. Dent (C. E.). — The amino-aciduria in Fanconi syndrome. A study making extensive use of techniques based on paper partition chromatography. *Biochem. J.*, 1947, **41**, 240. *(66)*

116. Dent (C. E.). — A study of the behaviour of some sixty amino-acids and other ninhydrin-reacting substances on phenol - « collidine » filter - paper chromatograms, with notes as to the occurrence of some of them in biological fluids. *J. biol. Chem.*, 1948, **43**, 169-180. *(52, 57, 65)*

117. Dervichian (D. G.). — Etude quantitative de l'hémolyse par les acides gras. (Deuxième note.) *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 338-342. *(219)*

118. Dominguez (X. A.). — The preparation of ninhydrin as a laboratory experiment. *J. chem. Educ.*, 1953, **30**, 624-625. *(15, 16, 21)*

119. Dose (K.) & Caputo (A.). — Die Anwendung der Hochspannungspherographie bei der quantitativen Totalanalyse von Proteinhydrolysaten. Untersuchungen am Lysozym. *Biochem. Z.*, 1956, **328**, 376-385. *(67)*

120. Dowmont (Y. P.) & Fruton (J. S.). — Chromatography of peptides as applied to transamidation reactions. *J. biol. Chem.*, 1952, **197**, 271-283. *(61, 65)*

121. Dubois-Ferrière (H.). — Etude expérimentale d'un nouvel hémostatique : l'α-naphtylamine-4-sulfonate de sodium (naphtionine S. N. S.). *Schweiz. med. Wochschr.*, 1950, **80**, 861-866. *(229)*

122. Duggan (E. L.) & Schmidt (C. L. A.). — The dissociation of certain amino acids in dioxane-water mixtures. *Arch. Biochem.*, 1943, **1**, 453-471. *(151)*

123. Dulière (W. L.). — The amino-groups of the proteins of human serum. Action of formaldehyde and ninhydrin. *Biochem. J.*, 1936, **30**, 770-772. *(62)*

124. Dulière (W. L.). — Etude immunologique des protéines sériques ninhydrinées. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1122-1124. *(75)*

125. Dulière (W. L.). — La gélatine ninhydrinée. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1472-1474. *(62)*

126. Dulière (W. L.). — Etude immunologique de la gélatine ninhydrinée. *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1474-1475. *(75)*

127. Dulong de Rosnay (C.) & Martin-Dupont (C.). — Activité antibiotique de la ninhydrine en présence de cystéine. *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 1741-1742. *(71)*

128. Ebert (L.). — Zur Abschätzung der Zwitterionenmenge in Ampholytlösung. *Z. phys. Chem.*, 1926, **121**, 385-400. *(153, 154)*

129. Eddy (G. W.) & Carson (N. B.). — Further tests of the more promising materials (used as insecticides) against the body louse. *J. econ. Entomol.*, 1946, **39**, 763-767; cité dans *Chem. Abstr.*, 1947, **41**, 3575 *h*. *(72)*

130. Edsall (J. T.) & Blanchard (M. H.). — The activity ratio of Zwitterions and uncharged molecules in ampholyte solutions. The dissociation constants of amino acids esters. *J. am. chem. Soc.*, 1933, **55**, 2337-2353. *(153, 154, 155)*

131. Eggerth (A. H.). — The effect of ninhydrin upon horse-serum-protein and antibodies. *J. Immunol.*, 1941, **42**, 199-218. *(62)*

132. Eggerth (A. H.). — The effect of ninhydrin upon rabbit-serum-protein and antibodies. *J. Immunol.*, 1942, **45**, 303-314. *(75)*

133. Ehrlich (J.), Knudsen (M. P.), Anderson (L. E.), Koepsell (H. J.), Coffey (G. L.), Kohberger (D. L.), Hillegas (A. B.) & Oyaas (J. E.). — Antibiotic studies of azaserine. *Nature*, 1954, **173**, 73. *(171)*

134. Emmrich (R.) & Götze (V.). — Papierchromatographische Analyse kleiner Mengen mit Ninhydrin reagierender Substanzen aus alkoholischen Extrakten der Rattenorgane. *Z. ges. inn. Med.*, 1955, **10**, 1124-1128. *(66)*

135. Estéve (A.), Oriol (A.) & Regné (F.). — Coagulantes sintéticos. *In* Memoria del XXXII Congreso internacional de Química industrial, Barcelona, 1949, 687 p., Gerardo Monge édit., Santaló 142, Barcelona; pp. 582-585. *(229)*

136. Faure (F.). — Ninhydrine et réaction de précipitation antigène-anticorps. Thèse Doct. Univ. (Sciences), Bordeaux 1953; 1 vol., 181 p., Impr. E. Drouillard édit., Bordeaux, 1953. *(76)*

137. Faure (F.). — Etude des modalités d'action de la ninhydrine sur les protéines sériques du Lapin et du Cheval. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1956, **95**, 141-151. *(62)*

138. Faure (F.). — Nouvelles recherches concernant l'action exercée par la ninhydrine sur les protéines sériques. Etude électrophorétique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1956, **38**, 1173-1183. *(62)*

139. Feigl (F.) & Costa Neto (C.). — Spot test for diketones and quinones based on catalytic effect. *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 397-399. *(29)*

140. Fergusson (J. H.) & Ralph (P. H.). — Ninhydrin, crystalline papain and fibrin clot. *Am. J. Physiol.*, 1942-1943, **138,** 648-651. *(62)*

141. Fernholz (M. E.) & Fernholz (H.). — Notiz über die Darstellung einiger Isoalloxazine. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1951, **84,** 257-260. *(203)*

142. Fieser (L. F.). — Ninhydrin. *In* Experiments in organic chemistry, 1 vol., 3e éd., 360 p., D. C. Heath & Cie édit., Boston, 1955; chap. 23. *(15, 17)*

143. Fischer (F. G.) & Bohn (H.). — Eine Mikrobestimmung des Ammoniaks, insbesondere in Protein-Hydrolysaten. *Z. physiol. Chem.*, 1955, **302,** 278-282. *(54, 68)*

144. Voir référence n° 341 a. *(103)*

145. Fisher (R. B.), Parsons (D. S.) & Holmes (R.). — Quantitative paper chromatography. *Nature*, 1949, **164,** 183. *(66)*

146. Fisher (R. B.), Parsons (D. S.) & Morrison (G. A.). — Quantitative paper chromatography. *Nature*, 1948, **161,** 764-765. *(66)*

147. Fitzpatrick (W. H.). — Spectrophotometric determination of amino-acids by the ninhydrin reaction. *Science*, 1949, **109,** 469. *(65, 67)*

148. Flatow (L.). — Ueber die Abderhaldensche Schwangerschaftsdiagnose. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61,** 468-469. *(69)*

149. Foreman (F. W.). — Rapid volumetric methods for the estimation of amino-acids, organic acids and organic bases. *Biochem. J.*, 1920, **14,** 451-473. *(151)*

150. Fosdick (L. S.) & Blackwell (R. Q.). — Scanning instrument for quantitative one-dimensional paper partition chromatography. *Science*, 1949, **109,** 314-315. *(66)*

151. Fowden (L.). — The quantitative recovery and colorimetric estimation of amino acids separated by paper chromatography. *Biochem. J.*, 1951, **48,** 327-333. *(66, 67)*

152. Fowden (L.) & Penney (J. R.). — Elimination of losses in the quantitative estimation of amino-acids by paper chromatography. *Nature*, 1950, **165,** 846-847. *(67)*

153. Fraenkel (E.). — Die Ninhydrinreaktion der Peptone. Nachtrag zu der Arbeit von G. Hälsen « Untersuchungen über Ferment- und Antifermentwirkung des Serums ». *Biochem. Z.*, 1914, **66,** 298. *(61)*

154. French (D.) & Edsall (J. T.). — The reactions of formaldehyde with amino acids and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 1945, **2,** 277-335. *(112)*

155. Frey-Wyssling (A.). — Submicroscopic morphology of protoplasm and its derivatives. 1 vol., 255 p., Elsevier Publ. Cie édit., New York & Amsterdam, 1948; p. 166. *(214)*

156. Fried (C.). — Zur Serodiagnostik der malignen Geschwülste. *Münch. med. Wochschr.*, 1913, **60,** 2782-2783. *(69)*

157. Fujita (K.), Oguri (M.), Mizuno (T.) & Sakaki (I.). — The changes of the ninhydrin-Schiff reaction of protein solutions by treatment with urea. *Nagoya J. med. Sci.*, 1957, **19,** 155-159. *(70)*

157 a. Fromageot (C.), Chatagner (F.) & Bergeret (B.). — La formation d'alanine par désulfination enzymatique de l'acide L-cystéine-sulfinique. *Biochim. biophys. Acta,* 1948, **2,** 294-301. *(173)*

158. Fromageot (C.), Jutisz (M.), Meyer (D.) & Pénasse (L.). — Méthode pour la caractérisation des groupes carboxyliques terminaux dans les protéines. Application à l'insuline. *Biochem. biophys. Acta,* 1950, **6,** 283-289. *(68)*

159. Gabriel (S.) & Neumann (A.). — Umlagerung von Phtalidderivaten in Abkömmlinge des α,γ-Diketohydrindens. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1893, **26,** 951-955. *(15)*

160. Gardell (S.), Heijkenskjöld (F.) & Rochnorlund (A.). — Oxidation of glucosamine and galactosamine with ninhydrin to arabinose and lyxose and their identification with paper chromatography. *Acta chem. scand.*, 1950, **4,** 970. *(68)*

161. Gautier (J. A.) & Pellerin (F.). — L'hydrazide nicotinique réactif de la fonction carbonylée. *Chim. anal.*, 1950, suppl., pp. 384-386. *(99)*

162. Gerok (W.). — Die quantitative papierchromatographische Bestimmung der Aminosäuren. *Z. physiol. Chem.*, 1955, **299,** 112-128. *(66)*

163. Gilmour (D.) & Calaby (J. H.). — The action of ninhydrin on the enzymatic and actincombining properties of myosin. *Austral. J. sci. Research.*, 1949, **2 B,** 216-225. *(52, 74, 109)*

164. Giroud (A.). — Recherches sur la nature chimique du chondriome. *Protoplasma,* 1929, **7,** 72-98. *(69)*

165. Glueck (H. I.). — Measurement of small amounts of thrombin by ninhydrin and its application to the study of thrombin function. *J. appl. Physiol.*, 1954, **6,** 650-660. *(62)*

166. Gomberg (M.) & Bachmann (W. E.). — Reducing action of a mixture of magnesium iodide (or bromide) and magnesium on aromatic ketones. Probable formation of magnesium subiodide (or subbromide). *J. am. chem. Soc.*, 1927, **49,** 236-256. *(28)*

167. Grassmann (W.) & Arnim (K. von). — Über die Reaktion des Ninhydrins und Isatins mit Prolin und Oxyprolin. *Ann. Chem.*, 1934, **509,** 288-303. *(36, 37, 38, 45, 58, 59, 60)*

168. Grassmann (W.) & Arnim (K. von). — Über neue Farbreaktionen des Pyrrolidins und Prolins. II. *Ann. Chem.*, 1935, **519,** 192-208. *(36, 37, 38, 58, 60)*

169. Grassmann (W.), Hanning (K.) & Plöckl (M.). — Eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Eiweisshydrolysaten durch Kombination von Elektrophorese und Chromatographie. *Z. physiol. Chem.*, 1955, **299**, 258-276. *(66)*

170. Green (A.). & Delaby (R.). — Sur les quinoxalothiamines et dérivés à structure analogue. *Bull. Soc. chim. France*, 1955, pp. 704-707. *(202)*

171. Griffiths (M.). — Inhibition of enzymatic transphosphorylation by alloxan and ninhydrin in tissue extracts. *Arch. Biochem.*, 1949, **20**, 451-456. *(52, 74, 109)*

172. Grobbelaar (N.), Pollard (J. K.) & Steward (F. C.). — New soluble nitrogen compounds (amino- and iminoacids and amides) in plants. *Nature*, 1955, **175**, 703-708. *(60)*

173. Gros (C.), Mandel (P.) & Rodesch (J.). — Action de la β-mercapto-éthylamine sur l'évolution des acides nucléiques de la rate après irradiation totale par les rayons X. *C. R. Acad. Sc.*, 1953, **236**, 2010-2012. *(110)*

174. Guillemet (R.). — Le problème du pain. II. La fermentation panaire. 1 vol., 101 p., Hermann & C° édit., Paris, 1937. *(62)*

175. Gustowski (W. L.). — Synteza ninhydryny. *Przemysl Chem.*, 1951, **7**, 694-696. *(15, 17)*

176. György (P.) & Rose (C. S.). — Tocopherol and hemolysis *in vivo* and *in vitro*. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1949, **52**, 231-239. *(72, 214)*

177. Haddow (A.), Elson (L. A.), Roe (E. M. F.), Rudall (K. M.) & Timmis (G. M.). — Artificial production of coat colour in the albino rat. *Nature*, 1945, **155**, 379-381. *(203)*

178. Haddow (A.) & Rudall (K. M.). — La coloration artificielle du pelage et la croissance des poils. *Endeavour*, 1945, **4**, 141-147. *(203)*

179. Halle (W.), Loewenstein (E.) & Pribram (E.). — Bemerkungen über Farbreaktionen des Triketohydrindenhydrats (Ninhydrin). *Biochem. Z.*, 1913, **55**, 357-369. *(9, 42, 52, 53, 147)*

180. Hamilton (P. B.). — Gasometric determination of glutamine amino acid carboxyl nitrogen in plasma and tissue filtrates by the ninhydrin-carbon dioxide method. *J. biol. Chem.*, 1945, **158**, 375-395. *(64)*

181. Hamilton (P. B.) & Ortiz (P. J.). — Proline and hydroxyproline : purification, reaction with ninhydrin, and some properties of their N-nitroso derivatives. *J. biol. Chem.*, 1950, **184**, 607-615. *(58)*

182. Hamilton (P. B.) & Ortiz (P. J.). — Purification of ninhydrin by crystallization. *Anal. Chem.*, 1950, **22**, 948. *(20, 83, 85)*

183. Hamilton (P. B.) & Van Slyke (D. D.). — The gasometric determination of free amino acids in blood filtrates by the ninhydrin-carbon dioxide method. *J. biol. Chem.*, 1943, **150**, 231-250. *(64)*

184. Harding (V. J.). — The « Ninhydrin » reaction. *Trans. roy. Soc. Can.*, 1915, Sec. III, **9**, 33-42. *(54)*

185. Harding (V. J.). — The alleged ninhydrin reaction with glycerol, etc... *J. biol. Chem.*, 1917, **30**, 205-208. *(52)*

186. Harding (V. J.) & MacLean (R. M.). — A colorimetric method for the estimation of amino-acid α-nitrogen. *J. biol. Chem.*, 1915, **20**, 217-230. *(51, 65, 67, 158)*

187. Harding (V. J.) & MacLean (R. M.). — A colorimetric method for the estimation of amino-acid α-nitrogen. II. Application to the hydrolysis of proteins by pancreatic enzymes. *J. biol. Chem.*, 1916, **24**, 503-517. *(61, 65, 67)*

188. Harding (V. J.) & MacLean (R. M.). — The ninhydrin reaction with amines and amides. *J. biol. Chem.*, 1916, **25**, 337-350. *(42, 54, 56)*

189. Harding (V. J.) & Warneford (F. H. S.). — The ninhydrin reaction with amino-acids and ammonium salts. *J. biol. Chem.*, 1916, **25**, 319-335. *(42, 43, 53)*

190. Hardy (W. B.) & Gardiner (S.). — Proteins of blood plasma. *J. Physiol. (London)*, 1910, **40**, lxviii-lxxi. *(76)*

191. Harned (H. S.) & Birdsall (C. M.). — The acidic ionization constant of glycine in dioxane-water solutions. *J. am. chem. Soc.*, 1943, **65**, 54-57. *(151)*

192. Harned (H. S.) & Birdsall (C. M.). — The basic ionization constant of glycine in dioxane-water solutions. *J. am. chem. Soc.*, 1943, **65**, 1117-1119. *(151)*

193. Harned (R. L.), Hidy (P. H.) & Kropp la Baw (E.). — Cycloserine. I. A preliminary report. *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 204-205. *(188)*

194. Harris (D. A.), Ruger (M.), Reagan (M. A.), Wolf (F. J.), Peck (R. L.), Wallick (H.) & Woodruff (H. B.). — Discovery, development and antimicrobial properties of D-amino-3-isoxazolidone (oxamycine), a new antibiotic produced by *Streptomyces garyphalus*. *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 183-190. *(188)*

195. Harris (L. J.). — The titration of amino- and carbonyl-groups in amino-acids, polypeptides, etc... Part IV-VI. Estimations in presence of formol and alcohol. *Proc. roy. Soc.*, 1924, **95 B**, 500-522. *(151)*

196. Harris (L. J.). — Zwitterions. I. Proof of the Zwitterion constitution of the amino-acid molecule. *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1080-1085. *(153)*

197. Hassal (C. H.). — The reaction of hydrogen peroxide on symmetrical triketones. *J. chem. Soc.*, 1948, pp. 50-52. *(17, 41)*

198. Hassall (C. H.). — The antibacterial activity of usnic acid and related compounds. *Experientia*, 1950, **6**, 463-464. *(72)*

199. Haugaard (G.), Tumerman (L.) & Silvestri (H.). — A study on the reaction of aldoses and amino acids. *J. am. chem. Soc.*, 1951, **73**, 4594-4600. *(112)*

200. Hausmann (W). — Amino acid composition of crystalline inorganic pyrophosphatase isolated from bakers yeast. *J. am. chem. Soc.*, 1952, **74**, 3181-3182. *(66)*

201. Hecht (E.) & Mink (C.). — Zur Methodik der Ninhydrinreaktion und Papierchromatographie im Zusammenhang mit Untersuchungen über gerinnungsphysiologisch interessierende Phosphatide. *Biochim. biophys. Acta*, 1952, **8**, 641-653. *(68)*

202. Hein (F.), & Griefahn-Osswald (I.). — Über das Auftreten der Ninhydrinreaktion bei Aminosäuren - Komplexen. *Pharm. Zentralhalle*, 1952, **91**, 270-272. *(67)*

203. Hellberg (H.). — Metoder för bestämning av fysostigmin. *Svensk farm. Tidskr.*, 1947, **51**, 560-570. *(68)*

204. Herzfeld (E.). — Versuche mit Triketohydrindenhydrat. Eine Methode zur quantitative Bestimmung der $-NH_2$. COOH-Gruppe. *Biochem. Z.*, 1914, **59**, 249-259. *(53, 65)*

205. Herzfeld (E.). — Ueber eine kolorimetrische Bestimmungsmethode der mit Triketohydrindenhydrat reagierenden Verbindungen. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 1503. *(65)*

206. Heusler (F.) & Schieffer (H.). — Ueber die Darstellung von Homophtalsäure und von β-Hydrindon aus dem Inden des Steinkohlentheers. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1899, **32**, 28-34. *(14, 21, 32)*

207. Hewlett (P. S.). — Insecticidal synergism with valone. *Nature*, 1954, **173**, 132. *(72)*

208. Hidy (P. H.). — Structural requirements for diabetogenic action in alloxan and related compounds. *J. biol. Chem.*, 1946, **163**, 307-311. *(72, 73)*

209. Hidy (P. H.), Hodge (E. B.), Young (V. V.), Harned (R. L.), Brewer (G. A.), Phillips (W. F.)., Runge (W. F.), Stavely (H. E.), Pohland (A.), Boaz (H.) & Sullivan (H. R.). — Structure and reactions of cycloserine. *J. am. chem. Soc.*, 1955, **77**, 2345-2346. *(188)*

210. Hirs (C. H. W.), Stein (W. H.) & Moore (S.). — The amino-acid composition of ribonuclease. *J. biol. Chem.*, 1954, **211**, 941-950. *(65)*

211. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — A quantitative aspect of the hypothetical incorporation of injected antigen in

resulting antibody. II. Experimental. *J. Immunol.*, 1932, **23**, 465-479. *(75)*

212. Hopkins (J. J.) & Wormall (A.). — Phenylisocyanate protein compounds and their immunological properties. II. The gelatin compounds. *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1706-1715. *(75)*

213. Hunsberger (I. M.), Lednicer (D.), Gutowsky (H. S.), Bunker (don L.) & Taussig (P.). — The determination of double-bond character in cyclic systems. III. Indan and *o*-xylene. *J. am. chem. Soc.*, 1955, **77**, 2466-2475. *(10)*

214. Hunter (I. R.), Dimick (K. P.) & Corse (J. W.). — Determination of amino-acids by ninhydrin oxydation and gas chromatography. Separation of leucine and *iso*leucine. *Chem. & Ind.*, 1956, pp. 294-295. *(63)*

215. Hutton (W. E.). — Ninhydrin staining of tissue sections. *Stain Technol.*, 1953, **28**, 173-175. *(69)*

216. Irion (W.) & Moosmüller (E.). — Anwendung der Papierchromatographie zur Beurteilung des Reaktionsverlaufs bei Hydrierungen. *Z. anal. Chem.*, 1953, **140**, 416-421. *(65)*

217. Ishii (K.) & Sevag (M. G.). — Inhibition by cycloserine of the synthesis of 5-amino-4-imidazolecarboxamide by *Escherichia coli*. *Antibiot. Chemother.*, 1956, **6**, 500-510. *(188)*

218. Jacobs (S.). — The determination of amino acids by ion exchange chromatography using a modified Moore and Stein technique and an improved photometric method. *In Résumé des Communications du XV^e Congrès de Chimie pure et appliquée, Lisbonne* 1956, 1 vol., 323 p.; section VIII, p. 212. *(20)*

219. Jacobs (S.). — An improved method for the quantitative determination of amino-acids by means of indanetrione hydrate. *Analyst*, 1956, **81**, 502-503. *(20, 67)*

220. Jepson (J. B.) & Smith (I.). — « Multiple dipping » procedure in paper chromatography : a specific test for hydroxy-proline. *Nature*, 1953, **172**, 1100-1101. *(66)*

221. Jepson (J. B.) & Stevens (B. J.). — A fluorescence test for serotonin and other tryptamines. *Nature*, 1953, **172**, 772-773. *(68)*

222. Jones (L. R.). — Colorimetric determination of cycloserine, a new antibiotic. *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 39-41. *(188)*

223. Jones (L. R.) & Riddick (J. R.). — Colorimetric determination of propionaldehyde. *Anal. Chem.*, 1954, **26**, 1035-1038. *(52, 68)*

224. Josien (M. L.) & Fuson (N.). — Contribution à l'étude infrarouge de la bande de valence C = O dans les composés polycycliques. *Bull. Soc. chim. France*, 1952, pp. 389-397. *(85)*

225. Jukes (T. H.) & Schmidt (C. L. A.). — The apparent dissociation constants of certain amino acids and related

substances in water-ethanol mixtures. *J. biol. Chem.*, 1934, **105**, 359-371. *(151)*

226. Kadota (I.). — Studies on experimental diabetes mellitus, as produced by organic reagents. Oxine diabetes and dithizone diabetes. *J. Lab. clin. Med.*, 1950, **35**, 568-591. *(74)*

227. Kaemmerer (H.), Clausz (M.) & Dieterich (K.). — Ueber das Abderhaldensche Dialysierverfahren. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 469-471. *(69)*

228. Kalant (H.). — Colorimetric ninhydrin reaction for measurement of alpha-amino nitrogen. *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 265-266. *(65)*

229. Katchalski (A.) & Sharon (N.). — Kinetics of aldose-amino acid interaction. *Biochim. biophys. Acta*, 1953, **10**, 290-301. *(112)*

230. Kaufmann (V.). — Ueber ein Analogon des Indigos in der Indenreihe : Diphtalyläthen. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1897, **30**, 382-387. *(16)*

231. Kawerau (E.) & Wieland (T.). — Conservation of amino-acid chromatograms. *Nature*, 1951, **168**, 77-79. *(67)*

232. Kay (L. M.) & Schroeder (W. A.). — The chromatographic separation and identification of some peptides in partial hydrolysates of silk fibroin. *J. am. chem. Soc.*, 1954, **76**, 3564-3568. *(65)*

233. Kay (R. E.), Harris (D. C.) & Entenman (C.). — Quantification of the ninhydrin color reaction as applied to paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1956, **63**, 14-25. *(66)*

234. Kellner (W.), Hellmuth (H.) & Martin (H.). — Verbesserung des Nachweises geringster Aminosäuremengen in Papierchromatogrammen. *Naturwiss.*, 1954, **41**, 304-305. *(65)*

235. Kent (P. W.), Lawson (G.) & Senior (A.). — Chromatographic separation of amino sugars and amino acids, using the N-(2,4-dinitrophenyl) derivatives. *Science*, 1951, **113**, 354-355. *(68)*

236. Keer (R. W.). — Adjuvants for pyrethrins in fly sprays. II. Adjuvant activity and chemical structure. *Australia Commonwealth Sci. Ind. Research Organisation*, 1951, Bull. n° 261, 32-48; in *Chem. Abstr.*, 1952, **46**, 2227 *h*. *(72)*

237. Khokhlov (A. S.), Shchukina (L. A.) & Shemyakin (M. M.). — Oxidative and oxidative-hydrolytic transformations of organic molecules. XVI. Oxidative-hydrolytic transformations of 2,3-dihydroxy-1,4-naphthoquinone and 1,2,3,4-tetraoxotetrahydronaphthalene. *J. gen. Chem. U. S. S. R.*, 1951, **21**, 1113-1129 (traduction anglaise); in *Chem. Abstr.* 1952, **46**, 1523 *f*. *(18, 19, 21, 24, 26, 27)*

238. Kilgore (L. B.), Ford (J. H.) & Wolfe (W. C.). — Insecticidal properties of 1,3-indanediones. *Ind. Engng. Chem.*, 1942, **34**, 494-497. *(72)*

239. Kipping (F. S.). — α-Hydrindone and its derivatives. *J. chem. Soc.*, 1894, **65**, 480-503. *(13)*

240. Klewitz (F.) & Krieger (E.). — Über die Ninhydrinreaktion der eosinophilen Granula. *Klin. Wochschr.*, 1923, **2**, 1366-1367. *(69)*

241. Klinger (F.). — Positive Ninhydrinreaktion auf Papierchromatogrammen durch reduzierende Substanzen in Gegenwart von NH_3-Spuren. *Naturwiss.*, 1955, **42**, 645. *(54, 68)*

242. Koninklijke Industrieele Maatschappij voorheen Noury & van der Lande. *Brev. holl.*, 57 247, 15 avril 1946. In *Chem. Abstr.*, 1947, **41**, 4590 *g*. *(62)*

243. Kornberg (H. L.) & Patey (W. E.). — Quantitative determination of 0,5-5 μg of amino acid nitrogen on paper chromatograms and in solution. *Biochem. biophys. Acta*, 1957, **25**, 189-193. *(54, 66)*

244. Kraemer (G.) & Spilker (A.). — Ueber das Inden und Styrol im Steinkohlentheer. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1890, **23**, 3276-3283. *(10)*

245. Krishnamurthy (K.) & Swaminathan (M.). — Quantitative determination of amino acids by circular paper chromatography. *Anal. Chem.*, 1955, **27**, 1396-1399. *(66)*

246. Krueger (R.). — Über die quantitative Bestimmung kleiner Mengen Glykokoll in Blut, Harn und Proteinhydrolysaten. *Helv. chim. Acta*, 1949, **32**, 238-251. *(63)*

247. Kuehl (F. A. Jr.), Wolf (F. J.), Trenner (N. R.), Peck (R. L.), Buhs (R. P.), Howe (E.), Putter (I.), Hunnewell (B. D.), Ormond (R.), Downing (G.), Lyons (J. E.), Newstead (E.), Chaiet (L.) & Folkers (K.). — D-4-amino-3-isoxazolidone, a new antibiotic. *J. am. chem. Soc.*, 1955, **77**, 2344-2345. *(188)*

248. Kuhn (R.), György (P.) & Wagner-Jauregg (T.). — Über Lactoflavin, den Farstoff der Molke. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1933, **66 B**, 1034-1038. *(208)*

249. Kuhn (R.) & Hammer (I.). — Umsetzungsprodukte von Chinonen und anderen Carbonylverbindungen mit Cystein. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1951, **84**, 91-95. *(51, 109, 172, 200)*

250. Kuhn (R.), Rudy (H.) & Wagner-Jauregg (T.). — Über Lactoflavin (Vitamin B_2). *Ber. deut. chem. Ges.*, 1933, **66 B**, 1950-1956. *(208)*

251. Kuhn (R.) & Söbele (R.). — Über Verdo-, Chloro- und Rhodo-flavin. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1937, **70 B**, 753-760. *(209)*

252. Kuhn (R.), Vetter (H.) & Rzeppa (H. W.). — Zur Spezifität des Lactoflavins; Ersatz der Methyl-gruppen durch den Tetramethylen- und Trimethylen-Ring. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1937, **70 B**, 1302-1314. *(204)*

253. Kuhn (R.) & Weygand (F.). — Verbesserung der Flavin-Synthese; Borsäure-Verfahren. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1935, **68 B**, 1282-1288. *(205)*

254. Кульберг (Л.). — Изучение аллоксана и некоторых его производных, как аналитических реактивов. *Журнал общей химии*, 1947, **17**, 1089-1098.
Kul'berg (L.). — Etude sur l'alloxanne et quelques-uns de ses dérivés comme réactifs analytiques. *J. gen. Chem. U. S. S. R.*, 1947, **17**, 1089-1098. *(67)*

225. Kumon (T.). — Colorimetrische Bestimmung des Harnindicans mittels Ninhydrin. *Z. physiol. Chem.*, 1935, **231**, 205-207. *(36, 68)*

256. Labarre (J.) & Martin (E. A.). — Dosage de la testostérone par la ninhydrine. *Rev. canad. Biol.*, 1954, **13**, 389-415. *(52)*

257. Laine (T.). — The microdetermination of leucine by the ninhydrin method. *Suomen Kemistil.*, 1938, **11 B**, 28. *(64)*

258. Lampé (A. E.). — Serologische Untersuchungen mit Hilfe des Abderhaldenschen Dialysierverfahrens bei Gesunden und Kranken. Studien über die Spezificität der Abwehrfermente. Vierte Mitteilung. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 463-466. *(69)*

259. Landua (A. J.) & Awapara (J.). — Use of modified ninhydrin reagent in quantitative determination of amino acids by paper chromatography. *Science*, 1949, **109**, 385. *(66)*

260. Laserstein (C.). — Biochemische Gewebsreaktionen mit Triketohydrindenhydrat. *Z. wissensch. Mikroskop.*, 1915, **32**, 288-293. *(69, 71, 72, 222)*

261. Lea (C. H.) & Rhodes (D. N.). — The ninhydrin reaction of unhydrolysed phospholipids. *Biochim. biophys. Acta*, 1955, **17**, 416-423. *(68)*

262. Lecomte (J.) & Bohrenstayn (C.). — Action anti-inflammatoire de la cystéinamine et de la cystinamine. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 359-362. *(110)*

263. Lecomte (J.), van Cauwenberge (H.) & Goblet (J.). — Action anti-inflammatoire chez le Rat de la cystéinamine et de son dérivé oxydé, la cystinamine. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147**, 1121-1124. *(110)*

264. Lederer (E.) & Lederer (M.). — Chromatography. 1 vol., 711 p., 2e éd., 1957, Elsevier édit., Amsterdam, 1957. *(65)*

265. Leismann (A.) & Turba (F.). — Quantitative Bestimmung von freiem neben peptidgebundenem Methionin in Form des β-Methyl-mercapto-propionaldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazons. *Z. physiol. Chem.*, 1957, **306**, 273-278. *(63, 64, 196)*

266. Lemierre (A.), Lenormant (C.), Pagniez (P.), Savy (P.), Fiessinger (N.), Gennes (L. de) & Ravina (A.). — Traité de médecine, 17 vol., Masson édit., Paris, 1948-1953. *(69)*

267. Lettré (H.). — Einige Versuche mit dem Mäuseascites-tumor. *Z. Krebsforsch.*, 1950, **57**, 1-13. *(203)*

268. Lettré (H.) & Fernholz (M. E.). — Darstellung einiger Flavine. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1940, **73 B**, 436-441. *(203)*

269. Levey (S.) & Suter (B.). — Effect of ascorbic acid on diabetogenic action of alloxan. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1946, **63**, 341-343. *(228)*

270. Levine (C.) & Chargaff (E.). — Procedures for the micro-estimation of nitrogenous phosphatide constituents. *J. biol. Chem.*, 1951, **192**, 465-479. *(68)*

271. Levy (A. L.) & Chung (D.). — Two-dimensional chromatography of amino acids on buffered papers. *Anal. Chem.*, 1953, **25**, 396-399. *(65)*

272. Lewis (P. R.). — The free amino-acids of invertebrate nerve. *Biochem. J.*, 1952, **52**, 330-338. *(66)*

273. Linko (P.). — A rapid method for simultaneous determination of ammonia and carbon dioxide evolved by ninhydrin from amino acids. *Suomen Kemistil.*, 1955, **28 B**, 96-99. *(27, 64)*

274. Lissitzky (S.) & Laurent (C.). — Dosage de la leucine, de l'isoleucine et de la phénylalanine des protéines par chromatographie sur papier. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 1177-1182. *(67)*

275. Löhr (K.). — Eine Methode zur chromatographischen Bestimmung von Isoleucin. *Biochem. Z.*, 1950, **320**, 115-119. *(63)*

276. Loew (O.). — Über Giftwirkung des Ninhydrins. *Biochem. Z.*, 1915, **69**, 111-115. *(71, 72, 73, 222)*

277. Loew (O.). — Ninhydrin als mikrochemisches Reagens auf Aminosäuren. *Flora*, 1917, **10**, 262-264. *(69)*

278. Lombard (R.). — Cétones. *In* Grignard (V.), Dupont (G.) et Locquin (R.). Traité de chimie organique, 23 vol., Masson & C^ie^ édit., Paris, 1935-1954; t. VII, p. 741. *(71)*

279. Longuet-Higgins (H. C.) & Coulson (C. A.). — A theoretical study of the Mills-Nixon effect. *Trans. Faraday Soc.*, 1946, **42**, 756-764. *(10)*

280. Lukens (F. D. W.). — Alloxan diabetes. *Physiol. Rev.*, 1948, **28**, 304-330. *(73)*

281. MacFadyen (D. A.). — Determination of ammonia evolved form α-amino acids by ninhydrin. *J. biol. Chem.*, 1944, **153**, 507-513. *(35, 58, 64)*

282. MacFadyen (D. A.). — Spectroradiometry of ninhydrin and some of its derivatives. *Fed. Proc.*, 1947, **6**, 273. *(21)*

283. MacFadyen (D. A.). — On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α-amino acids. I. Absorption spectra of ninhydrin and certain derivatives. *J. biol. Chem.*, 1950, **186**, 1-12. *(20, 21, 30, 33, 35, 46, 83, 114)*

284. MacFadyen (D. A.) & Fowler (N.). — On the mechanism of the reaction of ninhydrin with α-amino acids. II. A spectrophotometric study of hydrindantin reactions. *J. biol. Chem.*, 1950, **186**, 13-22. *(41, 46, 52, 53)*

285. MacFarren (E. F.). — Buffered filter paper chromatography of the amino acids. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 168-174. *(65)*

286. Mall (G.). — Mitteilung über eine *in vitro* auslösbare Serumreaktion. *Z. ges. exp. Med.*, 1938, **103**, 717-724. *(69)*

287. Martens (R.). — Considérations sur le dosage séparé des acides aminés et des polypeptides dans les produits de digestion des protéines. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 454-482. *(151)*

288. Martin (E. A.). — Dosage de la désoxycorticostérone par la ninhydrine et l'isatine. *Rev. can. Biol.*, 1956, **15**, 82-93. *(52, 68)*

289. Martin (A. J. P.) & Mittelmann (R.). — Quantitative microanalysis of amino-acids mixtures on paper partition chromatograms. *Biochem. J.*, 1948, **43**, 353-358. *(66)*

290. Mason (M. F.). — The manometric determination of amino-acids. *Biochem. J.*, 1938, **32**, 719-724. *(64)*

291. Maxwell (R. E.) & Nickel (V. S.). — Filament formation in *E. coli* induced by azaserine and other antineoplastic agents. *Science*, 1954, **120**, 270-271. *(171)*

292. Meunier (P.), Mentzer (C.) & Molho (D.). — Sur l'activité antivitaminique K (hémorragique) d'une indanedione. *C. R. Acad. Sc.*, 1947, **224**, 1666-1667. *(228)*

293. Meyer (H.) & Riklis (E.). — Influence of cations on the ninhydrin reaction for the determination of amino-acids. *Nature*, 1953, **172**, 543. *(67)*

294. Michaelis (L.). — Erwiderung auf die Bemerkung von E. Abderhalden. *Deut. med. Wochschr.*, 1914, **40**, 429. *(69)*

295. Michaelis (L.) & Lagermarck (L. von). — Die Abderhaldensche Schwangerschaftsdiagnose. *Deut. med. Wochschr.*, 1914, **40**, 316-319. *(69)*

296. Michaelis (L.) & Mizutani (M.). — Die Dissoziation der schwachen Elektrolyte in wässerig-alkoholischen Lösungen. *Z. phys. Chem.*, 1925, **116**, 135-159. *(151, 153)*

297. Michaelis (L.), Schubert (P. M.) & Smythe (C. V.). — Potentiometric study of the flavins. *J. biol. Chem.*, 1936, **116**, 587-607. *(209)*

298. Mills (W. H.) & Nixon (I. G.). — Stereochemical influences on aromatic substitution. Substitution derivatives of 5-hydroxyhydrindene. *J. chem. Soc.*, 1930, pp. 2510-2524. *(10)*

298 a. Miyamoto (S.) & Schmidt (C. L. A.). — On the equilibria between the zwitterion and the classical amino acids. *Univ. Calif. Publ. Physiol.*, 1932, **8**, 1-7. *(153)*

299. Mizutani (M.). — Die Dissoziation der schwachen Elektrolyte in wässerig-alkoholischen Lösungen. II. Die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Alkoholempfindlichkeit der Säuren und Basen. *Z. phys. Chem.*, 1925, **116,** 350-358; III. Die Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und Alkoholempfindlichkeit der zweibasischen Säuren in Äthylalkohol. *Ibid.*, 1925, **118,** 318-326; IV. Die Dissoziation der schwachen Elektrolyte in Methylalkohol. *Ibid.*, 1925, **118,** 327-341. *(151)*

300. Moor (P. de). — Le diabète alloxanique. Contribution à l'étude de la pathogénie du syndrome. 1 vol., 208 p., Masson édit., Paris, 1953. *(72, 73, 74)*

301. Moore (J. A.), Dice (J. R.), Nicolaides (E. D.), Westland (R. D.) & Wittle (E. L.). — Azaserine, synthetic studies. I. *J. am. chem. Soc.*, 1954, **76,** 2884-2887. *(171)*

302. Moore (S.) & Stein (W. H.). — Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. biol. Chem.*, 1948, **176,** 367-388. *(20, 46, 50, 51, 54, 60, 61, 65, 67)*

303. Moore (S.) & Stein (W. H.). — Chromatography of amino acids on starch columns. Solvent mixtures for the fractionation of protein hydrolysates. *J. biol. Chem.*, 1949, **178,** 53-77. *(65, 67)*

304. Moore (S.) & Stein (W. H.). — Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. *J. biol. Chem.*, 1954, **211,** 893-906. *(65)*

305. Moore (S.) & Stein (W. H.). — A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. biol. Chem.*, 1954, **211,** 907-913. *(54, 60, 65, 67, 182)*

306. Morel (A.). — Amino-acides. *In* Grignard (V.), Dupont (G.) & Locquin (R.), Traité de chimie organique, 23 vol., Masson & C^ie^ édit., Paris, 1935-1954; t. XIII, pp. 1-323. *(153)*

307. Mortreuil (M.) & Khouvine (Y.). — Dosage des acides aminés par les complexes colorés dicétohydrindylidène-hydrindamine-sels de cadmium. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1954, **36,** 425-428. *(67)*

308. Moubasher (R.). — Studies on indene derivatives. Part VI. Some new derivatives of triketoindane hydrate (« Ninhydrin »). *J. chem. Soc.*, 1949, pp. 1038-1039. *(27, 33, 34, 57, 89, 90)*

309. Moubasher (R.). — Studies on indene derivatives. Part. VIII. Methylenedioxyindanetrione. *J. chem. Soc.*, 1950, pp. 243-2245. *(14)*

310. Moubasher (R.), Awad (W.), Ibrahim (M.) & Othman (A. M.). — Studies on indene derivatives. Part VII,

New reactions of triketoindane and experiments with hydrindantin and related compounds. *J. chem. Soc.*, 1950, pp. 1998-2000. *(26)*

311. Moubasher (R.) & Ibrahim (M.). — Studies on indene derivates. Part V. *J. chem. Soc.*, 1949, pp. 702-703. *(49)*

312. Moubasher (R.) & Othman (A. M.). — Reactions between cyclic triketones and amines. Color reactions of ninhydrin and *peri*-naphthindane triones. *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72,** 2666-2667. *(55, 56, 57, 61)*

313. Moubasher (R.) & Othman (A. M.). — Reactions of alloxan and alloxantine. Structure of alloxantine and hydrindantine. *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72,** 2667-2669. *(28, 42, 55)*

314. Mustafa (A.) & Kamel (H.). — Reactions of *o*-quinone monoximes, monoimines and triketoindane-2-oxime. *J. am. chem. Soc.*, 1954, **76,** 124-127. *(27)*

315. Naftalin (L.). — Quantitative chromatographic estimation of α-amino-acids. *Nature*, 1948, **161,** 763. *(66)*

316. Neuberg (C.). — Beobachtungen über die Triketohydrindenreaktion. *Biochem. Z.*, 1913, **56,** 500-506. *(53, 54, 57)*

317. Neuberg (C.). — Über die Triketohydrindenreaktion. *Biochem. Z.*, 1914, **67,** 56-58. *(53, 54)*

318. Neuberger (A.). — The reaction between histidine and formaldehyde. *Biochem. J.*, 1944, **38,** 309-314. *(112)*

319. Neufville (R. de) & Pechmann (H. von). — Ueber das Diphenyltriketon. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1890, **23,** 3375-3387. *(10)*

320. Neuzil (E.). — Identification microcristalline de l'hydrazide de l'acide isonicotinique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1953, **91,** 122-130. *(100)*

321. Neuzil (E.) & Breton (J. C.). — Hémolyse des hématies traitées par la ninhydrine. *C. R. Soc. Biol.*, 1953, **147,** 686-688. *(214)*

322. Neuzil (E.) & Breton (J. C.). — Nouveaux dérivés de l'hydrate d'indanetrione. *Bull. Soc. chim. France*, 1953, p. 1041. *(89)*

323. Neuzil (E.) et Breton (J. C.). — Synthèse de nouveaux composés apparentés à la riboflavine. Résumés des communications, *III^e Congr. internat. Bioch., Bruxelles*, 1-6 août 1955; communication 1-20. *(205)*

324. Neuzil (E.) & Breton (J. C.). — Substances apparentées à la vitamine B_2; intérêt biologique; synthèse de sels d'indanoquinoxalinium. *Bull. et Mém. de l'Ecole préparatoire de médecine et de pharmacie de Dakar*, 1955, **3,** 180-200. *(203)*

325. Neuzil (E.) & Breton (J. C.). — Quelques aspects de la réaction de la ninhydrine avec les acides α-aminés. *Bull. et Mém. de l'Ecole préparatoire de médecine et de pharmacie de Dakar*, 1956, **4,** 204-219. *(39)*

326. Neuzil (E.) & Breton (J. C.). — Réactivité du groupement aminé de la D-cyclosérine avec la ninhydrine. Comm. présentée au *IX^e Congrès des Sociétés de Pharmacie de France, Clermont-Ferrand,* 7, 8 et 9 juin 1957. *(188)*

327. Neuzil (E.), Breton (J. C.) & Brachet-Cerutti (A.). — Quelques réactions du naphtionate de sodium. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux,* 1955, **94,** 268-280. *(91)*

328. Nicholson (D. E.). — Modified technique for the development of paper chromatograms. *Nature,* 1949, **163,** 954. *(66)*

329. Nicolaides (E. D.), Westland (R. D.) & Wittle (E. L.). — Azaserine, synthetic studies. II. *J. am. chem. Soc.,* 1954, **76,** 2887-2891. *(171)*

329 a. Niemann (C.), Lewis (R. N.) & Hays (J. T.). — The synthesis of the three isomeric *dl*-β-pyridylalanines. *J. am. chem. Soc.,* 1942, **64,** 1678-1682. *(52)*

330. Novellie (L.). — Quantitative paper chromatography of amino-acids. *Nature,* 1950, **166,** 1000. *(67)*

331. Odén (S.). — Developing fingerprints. *Brev. E. U.,* 2715-571, 16 août 1955; in *Chem. Abstr.,* 1955, **49,** 1627 *a*. *(66)*

332. Odén (S.) & Hofstein (B. von). — Detection of fingerprints by the ninhydrin reaction. *Nature,* 1954, **173,** 449-450. *(66)*

333. Okada (Y.) & Hanafusa (H.). — A new method for ultramicro-determination of ammonia or organic nitrogen. *Bull. chem. Soc. Japan,* 1954, **27,** 478. *(68)*

334. Oller (H.) & Stephan (R.). — Klinische Studien mit dem Dialysierverfahren nach Abderhalden. *Münch. med. Wochschr.,* 1914, **61,** 12-15; *ibid.,* 1914, **61,** 75-78; Klinische Studien mit dem Dialysierverfahren nach Abderhalden. II. Die serologische Tumordiagnose. *Ibid.,* 1914, **61,** 579-583, 632, 772. *(69)*

335. Ose & Hugimoto. — *Comm. 74^e Réunion ann. Soc. jap. Pharmacie,* 1954; cité par Yamagishi [523]. *(55)*

336. Ose (S.) Yoshimura (Y.). — Synthetic studies on penicillin. V. Color reaction of thiazolidine-4-carboxylic acid and its derivatives. (Identification of cysteine and β-mercapto-α-amino-carboxylic acids). *J. pharm. Soc. Japan,* 1950, **25,** 33-34. *(68)*

337. Пасхина (Т. С.). — Количественное определение аминокислот на хроматограммах при помощи реакции с нингидрином. *Биохимия,* 1954, **19,** 702-712.
Paskhina (T. S.). — Détermination des amino-acides sur les chromatogrammes à l'aide de la réaction à la ninhydrine. *Biokhimiya,* 1954, **19,** 702-712. *(66, 67)*

338. Patton (A. R.). — Introducing paper chromatography to biochemistry students. *J. chem. Educ.,* 1950, **27,** 60-61. *(65)*

339. Patton (A. R.) & Chism (P.). — Quantitative paper chro-

matography of amino acids. An evaluation of techniques. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 1683-1685. *(66)*

340. Payne (W. J.) & Kieber (R. J.). — The chromatographic determination of glucosamine with ninhydrin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **52**, 1-4. *(68)*

341. Pellizzari (G.). — Composti dell'allossane colle amine aromatiche. *Gazz. chim. ital.*, 1887, **17**, 409-425. *(91)*

341 a. Penzoldt (F.) & Fischer (E.). — Neue Reaktion der Aldehyde. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1883, **16**, 657-658. *(103)*

342. Pereira (A.) & Serra (J. A.). — Quantitative microdetermination of amino acids after paper chromatography. *Science*, 1951, **113**, 387-388. *(67)*

343. Pernis (B.) & Wunderly (C.). — Quantitative determination of amino acids on filter paper. Staining in two stages. *Biochim. biophys. Acta*, 1953, **11**, 209-214. *(66, 67)*

344. Perrone (J. C.), Iachan (A.) & Moreira Carneiro (L. A.). — The reaction of formaldehyde with the aromatic amino acids. I. The reaction with tryptophane. *An. Acad. brasil. Cienc.*, 1953, **25**, 107-125. *(112)*

345. Perry (H. M.) & Goldstein (G.). — Studies on primary amines. III. Limiting and optimum conditions for quantitative determination by the ninhydrin method. *J. Lab. clin. Med.*, 1955, **45**, 963-972. *(57, 68, 169)*

346. Pfeiffer (P.) & Hesse (T.). — Anile cyclischer Diketone. *J. prakt. Chem.*, 1941, **158**, 315-320. *(33, 34)*

347. Pfeiffer (P.) & Milz (E.). — Kondensationsprodukte des Indanons-1 mit Nitrosokörpern und Aldehyden. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1938, **71**, 272-279. *(33, 34, 35)*

348. Phillips (D. M. P.). — Partition chromatography of enzymic digests of insulin. *Biochim. biophys. Acta*, 1949, **3**, 341-347. *(67)*

349. Piccinelli (O.). — Cicloserina, oxamicina, PA 94, tre denominazioni di un medesimo antibiotico : il D-4-amino-3-isossazolidone. *Il Farmaco, Ed. sc.*, 1956, **9**, 619-629. *(188)*

350. Pichetto (A.). — Studio cristallografico dell'α-γ-dichetoidrindene. *Atti Accad. nazion. Lincei*, 1922, 5e sér., **31**, 143-146. *(86)*

351. Piez (K. A.), Irreverre (F.) & Wolff (H. L.). — The separation and determination of cyclic imino acids. *J. biol. Chem.*, 1956, **223**, 687-697. *(36, 59, 60)*

352. Plaut (F.). — Ueber Adsorptionserscheinungen bei dem Abderhaldenschen Dialysierverfahren. *Münch. med. Wochschr.*, 1914, **61**, 238-241. *(69)*

353. Polonovski (J.). — Action des amines quaternaires à chaîne grasse sur les protéines, les lipides et les cénapses lipoprotéiques. Thèse Doct. Sc., Paris 1949, Sér. A, 2288, N° 3159; 1 vol., 100 p., Masson édit., Paris, 1950. *(220)*

354. Polonovski (M.). — Sur le dosage colorimétrique des polypeptides par l'hydrate de tricétohydrindène (ninhydrine). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 28-29. *(61)*

355. Polonovski (M.). — Sur quelques causes d'erreur dans le dosage des acides α-aminés par la réaction à l'hydrate de tricétohydrindène (ninhydrine). *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1103-1105. *(65)*

356. Polonovski (M.). — Acides aminés et polypeptides sanguins. Etude biochimique et clinique. *J. Pharm. Belgique*, 1939, **21**, 39-42, 57-61, 75-80, 91-96. *(65)*

357. Polonovski (M.), Gonnard (P.) & Glotz (G.). — Sur quelques ninhydrylurées, alloxanylurées et sur leur constitution. *Bull. Soc. chim. France*, 1939, 5e Sér., **6**, 1557-1576. *(21, 33, 83)*

358. Polonovski (M.) & Moreno-Martín (F.). — Sur le dosage colorimétrique de la fonction amino-acide par l'hydrate de tricétohydrindène (ninhydrine). *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 583-584. *(67, 193)*

359. Polonovski (M.), Penaranda (F.) & Robert (L.). — Etude critique d'une méthode de dosage des acides aminés par chromatographie sur papier. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 801-806. *(66)*

360. Polonowski (M.) & Moreno-Martín (F.). — Sobre la utilización de la reacción de la ninhydrina en la dosificación de la función amino-ácido. *An. Soc. esp. Fís. Quím.*, 1935, **33**, 574-587. *(67, 193)*

361. Polson (A.). — Quantitative partition chromatography and the composition of *E. Coli*. *Biochim. biophys. Acta*, 1948, **2**, 575-581. *(66)*

362. Polson (A.). Mosley (V. M.) & Wyckoff (R. W. G.). — The quantative chromatography of silk hydrolysate. *Science*, 1947, **105**, 603-604. *(66)*

363. Ponder (E.). — Lipide and protein components in the surface ultrastructure of the erythrocyte. *Disc. Faraday Soc.*, 1949, **6**, 152-160. *(214)*

364. Ponder (E.). — Present concepts of the structure of the mammalian red cell. *Blood*, 1954, **9**, 227-235. *(214)*

365. Ponzio (G.) & Pichetto (A.). — Ricerche sulle diossime (V). *Gazz. chim. ital.*, 1923, **53**, 20-24. *(31, 32)*

366. Porath (J.) & Flodin (P.). — A new method for the detection of amino-acids, peptides, proteins and other buffering substances on paper. *Nature*, 1951, **168**, 202-203. *(66)*

367. Pratt (J. J. Jr.) & Auclair (J. L.). — Sensitivity of the ninhydrin reaction in paper partition chromatography. *Science*, 1948, **108**, 213-214. *(65)*

368. Prescott (B. A.) & Waelsch (H.). — A microdetermination of glutamic acid and its application to protein analysis. *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 331-343. *(63, 64)*

369. Purvis (J. E.). — The absorption spectra of triketohydrindene hydrate and certain derivatives. *J. chem. Soc.*, 1911, **99**, 1953-1960. *(21, 27, 32, 35, 83, 114)*

370. Régnier (S.). — Contribution à l'étude du mode d'action des protéases. Thèse Doct. Univ. (Pharmacie), Bordeaux, 1951, n° 360; 91 p., dactyl. *(52, 62, 75, 109)*

371. Retinger (J. M.). — The mechanism of the ninhydrin reaction. A contribution to the theory of color of salts of alloxantine-like compounds. *J. am. chem. Soc.*, 1917, **39**, 1059-1066. *(28, 41, 42)*

372. Riffart (H.). — Die Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin)-Reaktion als quantitative kolorimetrische Bestimmungsmethode des Aminosäurenstickstoffes; praktische Anwendung der Methode. *Biochem. Z.*, 1922, **131**, 78-96. *(54, 65)*

373. Riley (H. L.), Morley (J. F.) & Friend (N. A. C.). — Selenium dioxide, a new oxidising agent. Part I. Its reaction with aldehydes and ketones. *J. chem. Soc.*, 1932, pp. 1875-1883. *(16)*

374. Robert (L.) & Nolla (N.). — Sur l'interaction des aldéhydes, réductones et des acides aminés et protéines. III. Etude de l'hydrolyse enzymatique des protéines traitées par l'acétaldéhyde. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 807-814. *(112)*

375. Robert (L.) & Penaranda (F. S.). — Sur l'interaction des aldéhydes, réductones et des acides aminés et protéines. II. Cinétique de l'interaction des acides aminés et de l'acétaldéhyde, suivie par la chromatographie et l'ionophorèse sur papier. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 791-799. *(112)*

376. Robert (L.) & Penaranda (F. S.). — Aldehyde-protein interaction. I. Reaction of amino acids with lower aldehydes. *J. Polymer Sci.*, 1954, **12**, 337-350. *(112)*

377. Roberts (E.) & Frankel (S.). — γ-Aminobutyric acid in brain : its formation from glutamic acid. *J. biol. Chem.*, 1950, **187**, 55-63. *(66)*

378. Robuschi (L.). — Emolisi da allossana. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 1948, **24**, 1-2. *(215)*

379. Rockland (L. B.) & Dunn (M. S.). — Quantitative determination of amino acids on filter paper chromatograms by direct photometry. *J. am. chem. Soc.*, 1949, **71**, 4121-4122. *(66)*

380. Rockland (L. B.), Blatt (J. L.) & Dunn (M. S.). — Small scale filter paper chromatography. Filter papers and solvents. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 1142-1146. *(66)*

381. Rogina (B.) & Briski (B.). — Determination of small amounts of amino acids by a modified method. *Kem. ind. (Zagreb)*, 1954, **3**, 253-256. *(67)*

382. Rose (C. S.) & György (P.). — Hemolytic action of alloxan and alloxan derivatives. *Fed. Proc.*, 1949, **8,** 244-245. *(72)*

383. Rosen (H.). — A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1957, **67,** 10-15. *(67)*

384 Ross (W. C. J.). — Lipoid-soluble alloxazine derivatives. *J. chem. Soc.*, 1948, pp. 219-224. *(203)*

385. Rudy (H.) & Majer (O.). — 9-Propyl-8-aza-flavin. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1938, **71 B,** 1243-1248. *(204)*

386. Ruggieri (R.). — Idrazinoftalazine. I. Dosaggi. *Il Farmaco, Ed. pr.*, 1956, **11,** 571-576. *(68)*

387. Ruhemann (S.). — Cyclic di- and tri-ketones. *J. chem. Soc.*, 1910, **97,** 1438-1449. *(13, 14, 20, 21, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 57, 89, 95, 202)*

388. Ruhemann (S.). — Triketohydrindene hydrate. *J. chem. Soc.*, 1910, **97,** 2025-2031. *(25, 30, 31, 33, 35, 39, 93)*

389. Ruhemann (S.). — Triketohydrindene hydrate. Part III. Its relation to alloxan. *J. chem. Soc.*, 1911, **99,** 792-799. *(14, 15, 16, 28, 34, 39, 40, 51, 52, 57, 61, 71)*

390. Ruhemann (S.). — Triketohydrindene hydrate. Part IV. Hydrindantin and its analogues. *J. chem. Soc.*, 1911, **99,** 1306-1310. *(27, 28, 40, 52)*

391. Ruhemann (S.). — Triketohydrindene hydrate. Part V. The analogues of uramil and purpuric acid. *J. chem. Soc.*, 1911, **99,** 1486-1492. *(40, 42, 45, 192)*

392. Ruhemann (S.). — Triketomethylenedioxyhydrindene. *J. chem. Soc.*, 1912, **101,** 780-788. *(14)*

393. Sachs (F.) & Barschall (H.). — Ueber das Triketopentan. I. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1901, **34,** 3047-3054. *(10, 13)*

394. Sachs (F.) & Röhmer (A.). — Ueber Triketone. II. Methylphenyltriketon (Phenyltriketobutan). *Ber. deut. chem. Ges.*, 1902, **35,** 3307-3319. *(10)*

395. Saidel (L. J.). — A ninhydrin reaction differentiating N-terminal glycine peptides from other peptides. *J. biol. Chem.*, 1957, **224,** 445-451. *(61, 182)*

396. Saifer (A.) & Newhouse (A.). — Photometric microdetermination of plasma fibrinogen with a thrombin-ninhydrin procedure. *J. biol. Chem.*, 1954, **208,** 159-179. *(62)*

397. Saifer (A.) & Oreskes (I.). — Color reaction of amino acids with alloxan, isatin, and ninhydrin in circular paper chromatography. *Anal. Chem.*, 1956, **28,** 501-504. *(65)*

398. Saifer (A.) & Zymaris (M. C.). — Photometric microdetermination of human gamma globulin. I. Development of a quantitative flocculation-ninhydrin procedure. *J. clin. Invest.*, 1952, **31,** 1-11. *(63)*

399. Saifer (A.), Zymaris (M. C.) & Berger (H.). — Photometric microdetermination of human gamma globulin. II. Comparison of quantitative flocculation-ninhydrin method with electrophoretic method. *J. clin. Invest.*, 1952, **31**, 12-22. *(63)*

400. Salander (R. C.), Piano (M.) & Patton (A. R.). — Accuracy of quantitative paper chromatography in amino acid analysis. Addendum. *Anal. Chem.*, 1953, **25**, 1252-1253. *(67)*

401. Sarett (H. P.). — The effect of riboflavin analogues upon the utilization of riboflavin and flavin adenine dinucleotide by *Lactobacillus casei*. *J. biol. Chem.*, 1946, **162**, 87-97. *(205)*

402. Scheiber (J.) & Hopfer (G.). — Über die Enolisation β-mono-acylierter α,γ-Indandione. IV. Mitteilung über die Konstitutionsbestimmung bei Enolen. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1920, **53 B**, 697-706. *(17, 27, 32)*

403. Schlayer (C.). — Manometrische Bestimmung von Aminosäuren mit Ninhydrin im Warburg-Apparat. *Biochem. Z.*, 1938, **297**, 395-397. *(64)*

404. Schlenker (F. S.). — Determination of alpha-amino nitrogen as ammonia after oxidation of amino acids by ninhydrin. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, 1947, **19**, 471-474. *(58, 64)*

405. Schlenker (S.). — A system of analysis for plant tissue by use of plant juice. *Plant Physiol.*, 1943, **18**, 141-150. *(64)*

406. Schneider (F.), Reinefeld (E.) & Müller (H.). — Zur schnellen quantitativen Bestimmung von Aminosäuren, insbesondere von Glutaminsäure. *Biochem. Z.*, 1955, **327**, 189-194. *(66)*

407. Schöberl (A.), Ströder (J.) & Heim (L.). — Über die Beeinflussbarkeit der Erythrocytenpermeabilität durch Thiole. Theoretische Studien zu einer pädiatrischen Fragestellung. *Z. ges. exp. Med.*, 1950, **116**, 166-178. *(218)*

408. Schoen (G.). — Analisi chromatografica su carta. 1 vol., 352 p., Societa editoriale farmaceutica édit., Milan, 1954. *(65)*

409. Schönberg (A.) & Awad (W. I.). — Experiments with diazomethane and its derivatives. Part XV. Action of diazomethane on *o*-quinone monoximes. *J. chem. Soc.*, 1950, pp. 72-75. *(18)*

410. Schönberg (A.) & Azzam (R. C.). — Reactive methylene groups and nitroso-compounds. Abnormal action of acids on 1:2:3-triketones. *J. chem. Soc.*, 1939, pp. 1428-1430. *(24)*

411. Schönberg (A.) & Moubasher (R.). — Studies on indene derivatives. Part II. Triketohydrindene. *J. chem. Soc.*, 1943, pp. 71-72. *(20, 21, 24, 27)*

412. Schönberg (A.) & Moubasher (R.). — Studies on indene derivatives. Part III. The constitution and some reac-

tions of bishydroxyindone. The photochemical reduction of triketohydrindene. *J. chem. Soc.*, 1944, pp. 366-367. *(28)*

413. Schönberg (A.) & Moubasher (R.). — Studies on indene derivatives. Part IV. Synthesis of bis 1:3-diketoindanylidene and experiments with « ninhydrine » (triketoindane hydrate). *J. chem. Soc.*, 1949, pp. 212-214. *(28)*

414. Schönberg (A.) & Moubasher (R.). — The Strecker degradation of α-amino-acids. *Chem. Rev.*, 1952, **50,** 261-277. *(40)*

415. Schönberg (A.), Moubasher (R.) & Mostafa (A.). — Degradation of α-amino-acids to aldehydes and ketones by interaction with carbonyl compounds. *J. chem. Soc.*, 1948, pp. 176-182. *(40, 46, 55)*

416. Schott (H. F.), Rockland (L. B.) & Dunn (M. S.). — Investigations of amino acids, peptides, and proteins. XVI. A source of error in the manometric ninhydrin method for the analysis of amino acids and its suppression by the use of hydrazine. *J. biol. Chem.*, 1944. **154,** 397-411. *(64)*

417. Schram (E.), Dustin (J. P.), Moore (S.) & Bigwood (E. J.). — Application de la chromatographie sur échangeur d'ions à l'étude de la composition des aliments en acides aminés. *Anal. chim. Acta,* 1953, **9,** 149-162. *(65)*

418. Schram (E.), Moore (S.) & Bigwood (E. J.). — Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.*, 1954, **57,** 33-37. *(65)*

419. Schwartz (T. B.), Robertson (M. C.) & Holmes (L. B.). — A microdiffusion method for the determination of plasma glycine. *J. Lab. clin. Med.*, 1955, **46,** 657-661. *(63, 64)*

420. Schwartz (T. H.) & Engel (F. L.). — A photometric ninhydrin method for the measurement of proteolysis. *J. biol. Chem.*, 1950, **184,** 197-202. *(65)*

421. Schweet (R. S.). — The quantitative determination of proline and pipecolic acid with ninhydrin. *J. biol. Chem.*, 1954, **208,** 603-613. *(36, 59, 60)*

422. Schwert (G. W.). — A note on the application of the colorimetric ninhydrin determination to studies of enzyme kinetics. *J. biol. Chem.*, 1948, **174,** 411-413. *(65)*

423. Segonne (J.). — Recherches sur l'hydrazide de l'acide isonicotinique et quelques substances pyridiniques d'intérêt biologique. Thèse Doct. Méd., Bordeaux 1955, n° 90; 1 vol., 143 p., Impr. E. Drouillard édit., Bordeaux, 1955. *(197)*

424. Seligman (R. B.), Edmonds (M. D.), O'Keeffe (A. E.) & Lee (L. A.). — Paper chromatography of aldehydes and ketones as Girard derivatives. *Chem. & Ind.*, 1954, **27,** 1195. *(197)*

425. Selle (R. M.). — Determination of sour orange Rootstock by paper chromatography. *Nature,* 1954, **174,** 140-141. *(68)*

426. Shull (G. M.) & Sardinas (J. L.). — PA-94, an antibiotic identical with D-4-amino-3-isoxazolidinone (cycloserine, oxamycine). *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 398-399. *(188)*

427. Silberstein (O. O.), Adjarian (R. M.) & Thompson (J. F.). Determination of pipecolic acid in biological materials. *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 855-857. *(59, 60)*

428. Sizer (I. W.). — The biuret and ninhydrin tests for proteins as measured with Hardy's spectrophotometer. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1937-1938, **37**, 107-110. *(63)*

429. Slavík (K.). — Mikrostanovení amino-N v krevním seru ninhydrinem. *Čas. lék. čes.*, 1952, **91**, 273-274. *(67)*

430. Smith (A. M.) & Agiza (A. H.). — The titrimetric determination of carbon dioxide liberated in the ninhydrin reaction with amino-acids. *Analyst*, 1951, **76**, 619-623. *(58, 64)*

431. Smith (A. M.) & Agiza (A. H.). — The determination of amino acids colorimetrically by the ninhydrin reaction. *Analyst.*, 1951, **76**, 623-627. *(50, 65, 66, 67)*

432. Smith (I.). — Color reactions on paper chromatograms by a dipping technique. *Nature*, 1953, **171**, 43-44. *(65)*

433. Sobel (A. E.), Hirschman (A.) & Besman (L.). — A convenient microtitration method for the estimation of amino acids. *J. biol. Chem.*, 1945, **161**, 99-103. *(27, 58, 64)*

434. Spencer (J. N.) & Payne (H. G.). — Cycloserine experimental study. *Antibiot. Chemother.*, 1956, **6**, 708-717. *(188)*

435. Sprinson (D. B.) & Chargaff (E.). — On oxidative decarboxylations with periodic acid. *J. biol. Chem.*, 1946, **164**, 433-449. *(27)*

436. Ssadikov (W. S.) & Zelinsky (N. D.). — Einige Bemerkungen über die Triketohydrindenreaktion. *Biochem. Z.*, 1923, **141**, 105-108. *(41)*

437. Stammer (C. H.), Wilson (A. N.), Holly (F. W.) & Folkers (K.). — Synthesis of D-4-amino-3-isoxazolidone. *J. am. chem. Soc.*, 1955, **77**, 2346-2347. *(188)*

438. Stanley (M. M.) & Astwood (E. B.). — 1-Methyl-2-mercaptoimidazole an antithyroid compound highly active in man. *Endocrinology*, 1949, **44**, 588. *(110)*

439. Steenken (W. Jr.) & Wolinsky (E.). — Cycloserine : antituberculous activity *in vitro* and in the experimental animal. *Am. Rev. Tuberc.*, 1956, **73**, 539-545. *(188)*

440. Stempel (B.). — Nachweis von Insulin durch Ninhydrin. *Pharm. Zentralhalle*, 1955, **94**, 263. *(61)*

441. Štepan (J.) & Kral (V.). — Poznámky k přípravě indandiono-vych detekeních einidel. *Čas. lék. čes.*, 1953, **92**, 208-210. *(15, 16, 83)*

442. Stock (C. C.), Clarke (D. A.), Reilly (H. C.), Rhoads (C. P.) & Buckley (S. M.). — Azaserine, a new tumour-inhibitory substance. Studies with Crocker mouse sarcoma 180. *Nature*, 1954, **173**, 71. *(171)*

443. Stoffyn (P. J.) & Jeanloz (R. W.). — Identification of amino sugars by paper chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1954, **52,** 373-379. *(68, 190)*

444. Stoll (W.). — Ein Beitrag zur Wirkung des Alloxans auf die Langerhansschen Inseln. *Z. Naturforsch.*, 1946, **1,** 592-594. *(72, 73)*

445. Strecker (A.). — Notiz über eine eigenthümliche Oxydation durch Alloxan. *Ann. Chem.*, 1862, **123,** 363-365. *(40)*

446. Suter (C. M.) & Lutz (G. A.). — Some reaction of indene chloride and the *cis-* and *trans*-chlorohydrins mechanism of ketone formation. *J. am. chem. Soc.*, 1938, **60,** 1360-1365. *(14)*

447. Takagi (E.) & Mangyo (M.). — Studies on reactions between aromatic aldehydes and α-amino acids. V. Results obtained by paper chromatography. *J. pharm. Soc. Japan*, 1952, **72,** 812-815. *(112)*

448. Takagi, Tozaka & Sawaï. — *Comm. 6e Réunion ann. Soc. jap. Chimie*, 1953; cité par Yamagishi [524]. *(55)*

449. Tayeau (F.) & Faure (F.). — Ninhydrine et réaction antigène-anticorps. I. Action de la ninhydrine sur les immunsérums précipitants de Lapin. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35,** 1193-1199. *(76)*

450. Tayeau (F.) & Faure (F.). — Ninhydrine et réaction antigène-anticorps. II. Action de la ninhydrine sur les immunsérums précipitants de Cheval. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35,** 1201-1207. *(76)*

451. Tayeau (F.) & Faure (F.). — Ninhydrine et réaction antigène-anticorps. III. Essais d'interprétation de l'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums de Lapin et de Cheval. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35,** 1325-1334. *(76)*

452. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — Action de la ninhydrine sur les immunsérums précipitants. *1st. Intern. Congr. Biochem., Cambridge*, 19-25 août 1949; Abstr. Comm., n° 194/10, p. 455. *(76)*

453. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — Lipo-proteins in the precipitin reaction. The effect of ninhydrin. *Disc. Faraday Soc.*, 1949, **6,** 106-110. *(76)*

454. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — Ninhydrine et vitesse de floculation des immunsérums précipitants. *C. R. Acad. Sc.*, 1949, **229,** 1038-1040. *(76)*

455. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — Mécanisme d'action des substances lipidiques dans le phénomène de précipitation spécifique. Action de la ninhydrine. *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144,** 409-410. *(76)*

456. Tayeau (F.), Marquevielle (J.) & Marquevielle-Régnier (S.). — Action de la ninhydrine sur les groupements

thiol. I. Etude chimique. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1954, **92**, 231-238. *(52, 62, 72, 109)*

457. Tayeau (F.), Marquevielle (J.) & Marquevielle-Régnier (S.). — Action de la ninhydrine sur les groupements thiol. II. Application à l'étude des protéases. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1954, **92**, 239-244. *(75, 109)*

458. Tayeau (F.) & Masquelier (J.). — Les pigments de la graine d'arachide. I. Le chromogène. Constitution chimique. Propriétés physiologiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1949, **31**, 72-75. *(228)*

459. Tayeau (F.), Pautrizel (R.) & Szersnovicz-Léglise (F.). — Ninhydrine et réaction antigène-anticorps. IV. Ninhydrine et réaction d'hémolyse. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1953, **35**, 1335-1339. *(76)*

460. Teeters (W. O.) & Shriner (R. L.). — A new preparation of ninhydrin. *J. am. chem. Soc.*, 1953, **55**, 3026-3028. *(15, 16, 21, 31)*

461. Tetzner (E.). — Erhöhung der Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion durch Zusatz von Spuren von Ascorbinsäure. *Mikrochemie*, 1939, **27**, 141-144. *(50, 67)*

462. Thom (C. C.). — Chemical induction of genetic changes in *Aspergilli*. *J. Franklin Inst.*, 1942, **233**, 284-286. *(72)*

463. Thompson (J. F.), Zacharius (R. M.) & Steward (F. C.). — Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reaction of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure. *Plant Physiol.*, 1951, **26**, 375-397. *(67, 158)*

464. Toennies (G.) & Kolb (J. J.). — Techniques and reagents for paper chromatography. *Anal. Chem.*, 1951, **23**, 823-826. *(65)*

465. Tomita (M.). — Condensation of ninhydrin with indoxyl (A new test for indican). *J. oriental Med.*, 1924, **2**, 189-190. *(35)*

466. Tomita (M.) & Fukagawa (T.). — Über die Kondensation von Indol mit Triketohydrindenhydrat. *Z. physiol. Chem.*, 1926, **158**, 62-65. *(35)*

467. Traina (V.). — Effect of ascorbic acid on osmotic fragility of normal erythrocytes in saline. *Am. J. clin. Pathol.*, 1950, **20**, 641-643. *(218)*

468. Trevelyan (W. E.), Procter (D. P.) & Harrison (J. S.). — Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 1950, **166**, 444-445. *(68)*

469. Troll (B. W.) & Cannan (R. K.). — A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino- and iminoacids. *J. biol. Chem.*, 1953, **200**, 803-811. *(50, 59, 60, 67)*

470. Troll (W.) & Lindsley (J.). — A photometric method for the determination of prolin. *J. biol. Chem.*, 1955, **215**, 655-660. *(58, 59, 60)*

470 a. Tsunoo (S.). — Über die Derivate der Aminooxypropansulfonsäure. *J. Biochem. Tokio*, 1937, **25**, 375-391. *(54)*

471. Turba (F.) & Schrader-Beielstein (E. von). — Quantitative Bestimmung der homologen Monoamino-Monocarbonsäuren. *Naturwiss.*, 1947, **34**, 57-58. *(63, 64, 196)*

472. Ванаг (Г.) — Нитроинданднон. — Издательство Академии наук латвийской ССР, Рига 1954.
Vanag (G.). — Nitroindanedione. 1 vol., 118 p., Edition de l'Académie des Sciences de la République socialiste soviétique de Lettonie, Riga, 1954. *(15, 16, 17)*

473. Vanag (G.), Galvina (Z.) & Tirzitis (G.). — (Cost reduction in production of indanedione.) *Latvijas PSR Zinatnu Akad. Vestis*, 1954, pp. 131-132; cité in *Chem. Abstr.*, 1955, **49**, 8221 *h*. *(15)*

474. Vanag (G.) & Lode (A.). — Voir Wanag (G.) & Lode (A.) [499].

475. Vanag (G.) & Lode (A.). — Voir Wanag (G.) & Lode (A.) [500].

475 a. Van Alphen (J.). — The action of phenylhydrazine and hydrazine on fats and fatty acids. *Rec. Trav. chim.*, 1925, **44**, 1064-1070; cité in *Chem. Abstr.*, 1926, **20**, 998. *(99)*

476. Van der Schaaf (P. C.) & Huisman (T. H. J.). — Some improvements in the chromatographic separation of amino-acids with the aid of Dowex 50 ion exchanger. *Chem. Weekbl.*, 1954, **50**, 273-275. *(65)*

477. Van Slyke (D. D.) & Dillon (R. T.). — Gasometric determination of carboxyl groups in amino acids. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 1936, **34**, 362-363. *(64)*

478. Van Slyke (D. D.) & Dillon (R. T.). — Gasometric determination of carboxyl groups in amino acids. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. chim., Vol. jubilaire S. P. L. Sörensen*, 1937-1938, **22**, 480-486. *(64)*

479. Van Slyke (D. D.), Dillon (R. T.), MacFadyen (D. A.) & Hamilton (P.). — Gasometric determination of carboxyl groups in free amino acids. *J. biol. Chem.*, 1941, **141**, 627-669. *(46, 56, 58, 64, 158)*

480. Van Slyke (D. D.) & Hamilton (P. B.). — The synthesis and properties of ninhydrin ureide. *J. biol. Chem.*, 1943, **150**, 471-476. *(33)*

481. Van Slyke (D. D.) & Kirk (E.). — Comparison of gasometric, colorimetric and titrimetric determinations of amino nitrogen in blood and urine. *J. biol. Chem.*, 1933, **102**, 651-682. *(151)*

482. Van Slyke (D. D.), MacFadyen (D. A.) & Hamilton (P.). — Determination of free amino acids by titration of the carbon dioxide formed in the reaction with ninhydrin. *J. biol. Chem.*, 1941, **141**, 671-680. *(64)*

483. Van Slyke (D. D.), MacFadyen (D. A.) & Hamilton (P. B.). — The gasometric determination of amino acids in urine by the ninhydrin-carbon dioxide method. *J. biol. Chem.*, 1943, **150,** 251-258. *(64)*

484. Van Slyke (D. D.), Page (I. H.) & Kirk (E.). — A manometric micromethod for determination of carbon in organic compounds. *J. biol. Chem.*, 1933, **102,** 635-649. *(64)*

485. Vargas (L.) & Mundt (E.). — Estudio del poder diabetógeno del ácido barbitúrico, uracilo, ninhydrina y uretano en el conejo. *Bol. Soc. Biol. Santiago,* 1948, **5,** 54-62. *(72, 73)*

486. Veibel (S.) & Hauge (N.). — Identification et dosage des substances à fonction carbonyle à l'aide de l'acide *p*-hydrazinobenzoïque (*p*-carboxyphénylhydrazine). *Bull. Soc. chim. France,* 1938, 5e sér., **5,** 1506-1509. *(96)*

487. Vercauteren (R.). — Possible artefacts introduced by the ninhydrin and alloxan reactions in histochemical applications. *Nature,* 1951, **167,** 819-821. *(69)*

488. Virtanen (A. I.) & Laine (T.). — Ninhydrin reaction in the quantitative determination of different amino acids. *Nature,* 1938, **142,** 754. *(67)*

489. Virtanen (A. I.) & Laine (T.). — The use of ninhydrine reaction in the quantitative determination of amino acids. *Skand. Arch. Physiol.,* 1938, **80,** 392-397. *(63, 64, 67)*

490. Virtanen (A. I.), Laine (T.) & Toivonen (T.). — Quantitative Bestimmung von gewissen Aminosäuren nach der Ninhydrinmethode. *Z. physiol. Chem.,* 1940, **266,** 193-204. *(63, 64)*

491. Virtanen (A. I.) & Rautanen (N.). — On the micro method for estimation of amino acids based on formation of volatile aldehydes by ninhydrine oxidation. *Suomen Kemistil.,* 1946, **19 A,** 56-59. *(63, 64)*

492. Virtanen (A. I.) & Rautanen (N.). — Determination of certain amino-acids by ninhydrin oxidation to volatile aldehydes. *Biochem. J.,* 1947, **41,** 101-105. *(63, 64)*

493. Vlček (A. K.), Špalek (E.) & Kratky (L.). — The polarography of ninhydrin. *Coll. Trav. chim. Tchéc.,* 1950, **15,** 340-355. *(9, 22, 29, 211)*

494. Vogel (A. I.). — A text-book of practical organic chemistry. 1 vol., 1033 p., 2e éd., Longemans, Green & Cie édit., Londres, 1954. *(117)*

495. Vorlander (D.) & Spreckels (E.). — IV. Überführung quartärer Ammoniumsalze in tertiäre Amine mit Natriumalkoholat. *Ber. deut. chem. Ges.,* 1919, **52 B,** 309-311. *(151)*

496. Wachsmuth (H.). — Une réaction colorée de l'éphédrine. *J. Pharm. Belgique,* 1949, **4,** 186. *(55, 68)*

497. Wacker (L.). — Eine colorimetrische Methode zur Bestimmung der Molekulargrösse von Kohlehydraten. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1908, **41**, 266-274; Eine colorimetrische Methode zur Bestimmung der Molekulargrösse von Kohlehydraten. (Unterscheidung der primären von den sekundären und tertiären Alkoholen.) *Ibid.*, 1909, **42**, 2675-2680. *(103)*

498. Wanag (G.). — 2-Nitro-indandion-(1,3) und seine Salze. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1936, **69**, 1066-1074. *(16, 17)*

499. Wanag (G.) & Lode (A.). — Versuche zur Darstellung des Ninhydrins aus 2-Nitro-indandion (1,3). *Ber. deut. chem. Ges.*, 1938, **71 B**, 1267-1272. *(17, 21, 32)*

500. Wanag (G.) & Lode (A.). — β-Oxim des Indandions-(1,3) oder 2-Nitroso-indandion-(1,3) ? *Ber. deut. chem. Ges.*, 1939, **72 B**, 49-51. *(16, 18, 31)*

501. Warfield (L. M.). — Presence of dialysable products reacting to Abderhalden's ninhydrin in the urine of pregnant women. *J. am. med. Assoc.*, 1914, **62**, 436-437. *(69)*

502. Weber (H. H.). — Die Bjerrumsche Zwitterionentheorie und die Hydratation der Eiweisskörper. *Biochem. Z.*, 1930, **218**, 1-35. *(153)*

503. Welch (H.), Putnam (L. E.) & Randall (W. A.). — Antibacterial activity and blood and urine concentrations of cycloserine, a new antibiotic, following oral administration. *Antibiot. Chemother.*, 1955, **5**, 72-79. *(188)*

504. Wellington (E. F.). — An ultramicro method for quantitative determination of amino acids. *Canad. J. Chem.*, 1952, **30**, 581-591. *(66, 67, 158)*

505. Wellington (E. F.). — The effect of relative humidity on the reaction of ninhydrin with amino acids on paper chromatograms. *Canad. J. Chem.*, 1953, **31**, 484-487. *(67)*

506. Wessanen's Koninklijke Fabrieken N. V. — Improving flour. *Brev. holl.*, 63 002, 15 avril 1949. In *Chem. Abstr.*, 1949, **43**, 5130 *g*. *(62)*

507. Wieland (T.) & Wirth (L.). — Quantitative Trennung von Asparaginsäure und Glutaminsäure mit der säuren Aluminiumoxydsäule. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1943, **76 B**, 823-825. *(65)*

508. Wiggins (L. F.) & Williams (J. H.). — Use of *n*-butanol-formic acid-water mixture in the paper chromatography of amino-acids and sugars. *Nature*, 1952, **170**, 279-280. *(67)*

509. Williams (R. J.) & Kirby (H.). — Paper chromatography using capillary ascent. *Science*, 1948, **107**, 481-483. *(66)*

510. Willstaetter (R.) & Waldschmidt-Leitz (E.). — Alkalimetrische Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1921, **54 B**, 2988-2993. *(151)*

511. Wislicenus (W.). — Ueber die Vereinigung verschiedener Ester durch Natrium. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1887, **20,** 589-595. *(15)*

512. Wislicenus (W.). — Einwirkung von Essigester auf Phtalsäureester. *Ann. Chem.*, 1888, **246,** 347-355. *(15, 31)*

513. Wislicenus (W.) & Kötzle (A.). — Ueber Derivate des Diketohydrindens. *Ann. Chem.*, 1889, **252,** 72-79. *(32)*

514. Wislicenus (W.) & Reitzenstein (F.). — Zur Kenntniss des Diketohydrindens. *Ann. Chem.*, 1893, **277,** 362-374. *(32, 95)*

515. Woker (G.) & Antener (I.). — Über Chinonreaktionen. *Helv. chim. Acta*, 1937, **20,** 1260-1270. *(43)*

516. Woiwod (A. J.). — Microestimation of amino-nitrogen and its application to paper partition chromatography. *Nature*, 1948, **161,** 169. *(66)*

517. Woiwod (A. J.). — A technique for examining large numbers of bacterial culture filtrates by partition chromatography. *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3,** 312-318. *(66, 67)*

518. Woiwod (A. J.). — A method for the estimation of micro amounts of amino nitrogen and its application to paper partition chromatography. *Biochem. J.*, 1949, **45,** 412-417. *(66)*

519. Woolley (D. W.). — Production of riboflavin deficiency with phenazine analogues of riboflavin. *J. biol. Chem.*, 1944, **154,** 31-37. *(205)*

519 a. Work (E.). — Chromatographic investigations of amino acids from micro-organisms. II. Isolation of two unknow substances from *Corynebacterium diphtheriae*. *Biochim. biophys. Acta*, 1950, **5,** 204-209. *(176)*

519 b. Work (E.). — The isolation of α,ε-diaminopimelic acid from *Corynebacterium diphtheriae* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.*, 1951, **49,** 17-23. *(176)*

520. Yamagishi (M.). — Studies on ninhydrin reaction. II. The intermediates in ninhydrin reaction. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74,** 27-29. *(35, 48, 55, 57)*

521. Yamagishi (M.). — Studies on ninhydrin reaction. III. Structure of the intermediate in ninhydrin reaction. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74,** 599-601. *(35, 55, 57)*

522. Yamagishi (M.). — Studies on ninhydrin reaction. V. Role of hydrindantin, etc..., in ninhydrin reaction. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74,** 1004-1008. *(50)*

523. Yamagishi (M.). — Studies on ninhydrin reaction. VI. Ninhydrin reaction of secondary amines. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74,** 1042-1044. *(55, 56, 158)*

524. Yamagishi (M.). — Studies on ninhydrin reaction. VII. Ninhydrin reaction of diamines. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74,** 1075-1077. *(57, 175, 185)*

525. Yamagishi (M.). — Studies on ninhydrin reaction. VIII. Ninhydrin reaction of $R_1R_2CH\text{-}NH_2$ type compounds and its homologs. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74**, 1233-1235. *(56, 57, 169, 187)*

526. Yamagishi (M.) & Yoshida (T.). — Studies on ninhydrin reaction. I. Colorimetric determination of α-amino-acids. *J. pharm. Soc. Japan*, 1953, **73**, 675-676. *(50, 67)*

527. Yamagishi (M.) & Yoshida (T.). — Studies on ninhydrin reaction. IV. Determination of pantothenic acid. *J. pharm. Soc. Japan*, 1954, **74**, 1001-1004. *(56, 65)*

528. Yanari (S.). — The reaction of ninhydrin with dipeptides : differences in reaction rates and theoretical yields. *J. biol. Chem.*, 1956, **220**, 683-689. *(61, 164, 182)*

529. Yasuma (A.) & Ichikawa (T.). — Ninhydrin-Schiff and alloxan - Schiff staining. A new histological staining method for protein. *J. Lab. clin. Med.*, 1953, **41**, 296-299. *(69)*

530. Yemm (E. W.) & Cocking (E. C.). — The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*, 1956, **80**, 209-213. *(50, 67)*

531. Zaki (A.). — Oxidation of *p*-aminophenyltrimethylammonium methosulfate and some quaternary ammonium derivatives. *J. chem. Soc.*, 1930, pp. 1078-1084. *(34)*

532. Ziegler (J. H.) & Locher (M.). — Ueber die Tartrazine, eine neue Klasse von Farbstoffen. *Ber. deut. chem. Ges.*, 1887, **20**, 834-840. *(103)*

533. Zittle (C. A.). — Inhibitors for ribonuclease. *J. Franklin Inst.*, 1948, **246**, 266-268. *(74)*

534. Zweig (G.). — Preservation of ninhydrin-amino acid chromatograms. *Anal. chem.*, 1956, **28**, 428. *(67)*

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 1

PREMIÈRE PARTIE

La ninhydrine : synthèse, propriétés physicochimiques, propriétés chimiques, aspects biologiques.

Chapitre premier. — Synthèse de la ninhydrine 13

I. — Préparations à partir d'une indanone 13

II. — Préparations à partir de l'indanedione-1,3 15

III. — Modes d'obtention divers 17

Chapitre II. — Propriétés physicochimiques de la ninhydrine 20

Chapitre III. — Propriétés chimiques de la ninhydrine .. 23

Section I. — Réactions de la ninhydrine avec quelques réactifs chimiques généraux 24

I. — Action des acides et des bases 24

II. — Action des oxydants et des réducteurs 27

Section II. — Réactions fonctionnelles des groupements carbonylés 30

Action des halogénures de phosphore 30

Action des composés à hydrogène mobile 30

Action de l'acide cyanhydrique 31

Action de l'hydroxylamine 31

Action des dérivés de l'hydrazine 32

Action des dérivés de l'acide carbonique 32

Action des monoamines 33

Action des diamines 35

Action de divers composés hétérocycliques 35

Pages

Section III. — Réactions de la ninhydrine avec les acides α-aminés 39

I. — Le mécanisme de la réaction ninhydrine-α-aminoacides 39

II. — Spécificité de la réaction 51

Réaction colorée atypique de la ninhydrine avec certains acides α-aminés 51

Réaction colorée de la ninhydrine avec des substances non azotées 52

Réaction de la ninhydrine avec les sels d'ammonium 53

Réaction de la ninhydrine avec les amines. 54

Réaction de la ninhydrine avec les acides α-iminés 58

Réaction de la ninhydrine avec les peptides 61

Réaction de la ninhydrine avec les protéines 61

III. — Applications analytiques 63

A. — Applications de la ninhydrine à l'analyse des aminoacides 63

B. — Applications de la ninhydrine à l'analyse d'autres substances 68

IV. — Applications diverses 68

A. — La réaction d'Abderhalden 68

B. — Utilisation histologique 69

CHAPITRE IV. — PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES DE LA NINHYDRINE. 71

I. — Toxicité de la ninhydrine 71

II. — Ninhydrine et enzymes 74

III. — Ninhydrine et réactions immunologiques 75

DEUXIÈME PARTIE

Recherches chimiques et biologiques sur la ninhydrine.

CHAPITRE PREMIER. — QUELQUES NOUVELLES CARACTÉRISTIQUES PHYSIQUES DE LA NINHYDRINE 79

I. — Etude chromatographique de la ninhydrine..... 79

II. — Etude potentiométrique de la ninhydrine 81

III. — Spectre d'absorption infrarouge de la ninhydrine. 83

Pages

IV. — Quelques caractéristiques cristallographiques de la ninhydrine 85

Conclusions du chapitre premier 88

Chapitre II. — Quelques nouveaux dérivés de la ninhydrine 89

I. — Réaction de la ninhydrine avec quelques amines cycliques 89

II. — Réaction de la ninhydrine avec quelques dérivés azotés de l'acide carbonique 93

III. — Réaction de la ninhydrine avec quelques dérivés de l'hydrazine 95

A. — Réaction de la ninhydrine avec quelques hydrazines 96

B. — Réaction de la ninhydrine avec quelques hydrazides 99

C. — Réaction colorée de la ninhydrine avec la *p*-sulfophénylhydrazine 103

IV. — Réaction de la ninhydrine avec deux composés soufrés 109

Conclusions du chapitre II 111

Chapitre III. — Recherches sur la réaction ninhydrine-aminoacides 112

Section I. — La réaction ninhydrine-aminoacides en présence de différents alcools 113

I. — Recherche d'un protocole 113

II. — Etude comparée de l'influence de différents alcools aliphatiques 116

III. — Etude particulière de l'influence de l'alcool butylique tertiaire 124

A. — Etude des paramètres 124

1° Rôle de la concentration en alcool.. 125

2° Rôle de la concentration en amino-acide 140

3° Rôle de la concentration en ninhydrine 142

4° Influence de quelques sels minéraux. 145

B. — Interprétation des résultats : le mode d'action des alcools dans la réaction ninhydrine-aminoacides 148

Pages

C. — Etude comparée de la réactivité des divers aminoacides et de quelques substances apparentées, avec la ninhydrine, en présence d'alcool butylique tertiaire. 158
1° Produits expérimentés 159
2° Discussion des résultats 163

Section II. — Etude chromatographique de la réaction ninhydrine-aminoacides 190

I. — Réaction ninhydrine-aminoacides en milieu aqueux 191

II. — Réaction ninhydrine-aminoacides en présence d'éthanol 194

III. — Identification des aldéhydes qui ont pris naissance au cours de la réaction ninhydrine-aminoacides 196

Section III. — Etude microcristalloscopique de la réaction ninhydrine-aminoacides 197

Conclusions du chapitre III 201

Chapitre IV. — Sels d'indanoquinoxalinium apparentés a la riboflavine 202

I. — Analogues de la riboflavine renfermant d'autres cycles 203

II. — Préparation des sels d'indanoquinoxalinium 205

III. — Propriétés physicochimiques des sels d'indanoquinoxalinium 207

IV. — Structure des produits obtenus 209

V. — Propriétés biologiques 211

Conclusions du chapitre IV 213

Chapitre V. — Hémolyse des hématies traitées par la ninhydrine 214

I. — Action de la ninhydrine sur les hématies 214

II. — Hémolyse des hématies traitées par la ninhydrine. 215
A. — Hémolyse par hypotonie 215
B. — Hémolyse par les agents superficiellement actifs 219

Conclusions du chapitre V 220

Pages

Chapitre VI. — Etude de la toxicité et de quelques propriétés pharmacodynamiques de la ninhydrine 222

I. — Toxicité aiguë de la ninhydrine vis-à-vis de la Souris blanche 223

II. — Mécanisme de l'action toxique de la ninhydrine : essais de protection par différentes substances. 225

III. — Etude de quelques propriétés pharmacodynamiques chez le Chien 229

Conclusions du chapitre VI 234

Conclusions générales 237

Appendice (tableaux XIX à XXXI) 243

Références bibliographiques 245

Bordeaux. — Impr. E. Drouillard, 3, place de la Victoire.